

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, C12N 15/11, A61K 31/70, 48/00, C07K 16/18, G01N 33/50, A01K 67/027		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/15785 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. März 2000 (23.03.00)																		
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06534 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. September 1999 (06.09.99) (30) Prioritätsdaten: <table><tr><td>198 41 299.1</td><td>10. September 1998 (10.09.98)</td><td>DE</td></tr><tr><td>199 04 825.8</td><td>5. Februar 1999 (05.02.99)</td><td>DE</td></tr><tr><td>199 12 049.8</td><td>18. März 1999 (18.03.99)</td><td>DE</td></tr><tr><td>199 14 229.7</td><td>29. März 1999 (29.03.99)</td><td>DE</td></tr><tr><td>199 19 989.2</td><td>30. April 1999 (30.04.99)</td><td>DE</td></tr><tr><td>199 23 539.2</td><td>21. Mai 1999 (21.05.99)</td><td>DE</td></tr></table> (71)(72) Anmelder und Erfinder: SIFFERT, Winfried [DE/DE]; Schönleinstrasse 49, D-45147 Essen (DE). (74) Anwalt: COHAUSZ & FLORACK; Kanzlerstrasse 8a, D-40472 Düsseldorf (DE).		198 41 299.1	10. September 1998 (10.09.98)	DE	199 04 825.8	5. Februar 1999 (05.02.99)	DE	199 12 049.8	18. März 1999 (18.03.99)	DE	199 14 229.7	29. März 1999 (29.03.99)	DE	199 19 989.2	30. April 1999 (30.04.99)	DE	199 23 539.2	21. Mai 1999 (21.05.99)	DE	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
198 41 299.1	10. September 1998 (10.09.98)	DE																			
199 04 825.8	5. Februar 1999 (05.02.99)	DE																			
199 12 049.8	18. März 1999 (18.03.99)	DE																			
199 14 229.7	29. März 1999 (29.03.99)	DE																			
199 19 989.2	30. April 1999 (30.04.99)	DE																			
199 23 539.2	21. Mai 1999 (21.05.99)	DE																			
(54) Title: GENE MODIFICATION IN THE GENE FOR THE G β 3-SUB-UNIT OF HUMAN G-PROTEIN (54) Bezeichnung: GENVERÄNDERUNG IM GEN FÜR DIE G β 3-UNTEREINHEIT DES HUMANEN G-PROTEINS (57) Abstract <p>The invention relates to the use of a gene modification in the gene for the Gβ3-sub-unit of the human G-protein for determining the risk of a G-protein dysregulation-associated disease, cytosine being substituted by thymine in position 825 in anlage 2 and/or cytosine being substituted by thymine in position 1429 in anlage 2.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer Genveränderung im Gen für die Gβ3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Ermittlung des Risikos, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken.</p>																					

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins

Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Nukleinsäuresequenz codierend für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, sowie die Verwendung von G β 3-Untereinheiten der G-Proteine zur Ermittlung des Risikos, an einer Krankheit, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) haben eine herausragende Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer Signale nach Stimulation von Hormonrezeptoren und anderen Rezeptoren, welche nach Rezeptoraktivierung eine Konformationsänderung durchmachen. Dies führt zur Aktivierung von G-Proteinen, welche nachfolgend intrazelluläre Effektoren (z.B. Ionenkanäle, Enzyme) aktivieren oder hemmen können. G-Proteine steuern die intrazelluläre Signalverarbeitung nach hormoneller Stimulation heptahelikaler Rezeptoren in der Zellmembran, aber auch nach Stimulation von Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Zu den regulierten Zellfunktionen gehören unter anderem Zellteilung und Zellwachstum, Kontraktion, Freisetzung von Zellinhaltsstoffen u.v.m..

Heterotrimere G-Proteine sind aus drei Untereinheiten, den α -, β - und γ -Untereinheiten, zusammengesetzt. Bislang wurden mehrere unterschiedliche α -Untereinheiten, 5 β -Untereinheiten und ca. 12 γ -Untereinheiten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden nachgewiesen (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M., Signaltransduction by G proteins: 1994 edition. J.Recept.Res. 15:213-252,1995; Offermans, S. and Schultz, G.

Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 350:329-338, 1994; Nürnberg, B., Gudermann, T. and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G proteins. FASEB J. 9:1059-1066, 1995).

Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter α -Untereinheiten kann durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden. Dazu gehören insbesondere die α -Isoformen α -i1, α -i2 und α -i3 sowie unterschiedliche α -Untereinheiten. Solche G-Proteine werden auch als "PTX-sensitive G-Proteine bezeichnet.

$\beta\gamma$ -Untereinheiten erfüllen wesentliche Funktionen bei der G-Protein-Aktivierung sowie bei der Modulation intrazellulärer Reaktionen. Alle bisher bekannten G-Protein- β -Untereinheiten weisen auf der Ebene der Nukleotidsequenz und auf der Ebene der Aminosäuresequenz hohe Homologien auf. Dabei werden diese Ähnlichkeiten nicht nur innerhalb der humanen β -Untereinheiten ($G\beta 1$, $G\beta 2$, $G\beta 3$) gefunden, sondern auch im Vergleich zu β -Untereinheiten anderer Spezies, beispielsweise Fruchtfliege oder Hefe.

Kürzlich konnte im humanen GNB3-Gen, das für die $G\beta 3$ -Untereinheit kodiert, eine Basenveränderung in Exon 10 (C825T) beschrieben werden, die zum alternativen Spleißen von Exon 9 führt. Das alternative Spleißen wird durch eine kryptische Spleißstelle in Exon 9 begünstigt, wobei der entfernt liegende Basenaustausch C825T das Spleißen verstärkt. Das alternative Spleißprodukt ($G\beta 3s$) weist einen Verlust von 123 bp (= 41

Aminosäuren) auf. Das GNB3-825T-Allel ist mit gesteigerter Aktivierbarkeit von G-Proteinen und der essentiellen Hypertonie assoziiert (Siffert, W., Rosskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998; Clapham, D.E. and Neer, E.J. G protein $\beta\gamma$ subunits. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 37:167-203, 1997; Hamm, H.E. and Gilchrist, A. Heterotrimeric G proteins. Curr.Opin.Cell Biol. 8:189-196, 1996).

Dieses humane GNB3-Gen ist von Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T. Jr., Helman, L.J. und Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (6), 2329-2333 (1990)) beschrieben worden.

Gegenstand der Erfindung ist eine neue humane cDNA für die G β 3-Untereinheit von humanem G-Protein.

Überraschenderweise hat es sich nämlich herausgestellt, daß es im humanen GNB3-Gen einen weiteren Polymorphismus gibt, der im folgenden "C1429T" genannt wird. Dieser Polymorphismus findet sich an Position 1429 der cDNA. Dies entspricht dem Exon 11 der prä-mRNA, jedoch außerhalb des offenen Leserahmens im 3' nicht-translatierten Bereich.

Dieser Polymorphismus steht in einem ausgeprägten Verteilungsungleichgewicht mit dem bekannten C825T-Polymorphismus, derart, daß nahezu alle GNB3-825C-Allele den Genotyp 1429C und nahezu alle GNB3-825T-Allele den Genotyp 1429T aufweisen. Somit eignet sich dieser Polymorphismus C1429T ebenso gut wie der Polymorphismus C825T zum Nachweis der gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen.

Der Polymorphismus C1429T ist bezogen auf die Sequenz der cDNA, wie sie von Levine und Mitarbeitern beschrieben wurde. Hierbei kommt es an Position 1429 der cDNA zu einem Austausch des C durch ein T:

```
1381 ggcctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcac(c/t)a
ctagggtcct
```

In Anhang 1 ist die vollständige cDNA-Sequenz aufgelistet.

Bezogen auf die genomische Sequenz des GBN3 Locus, wie er von Ansari-Lari und Mitarbeitern beschrieben wurde (Ansari-Lari, M.A., Muzny, D.M., Lu, J., Lu, F., Lilley, C.E., Spanos, S., Malley, T. und Gibbs, R.A., A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13. Genome Res. 6 (4), 314-326 (1996)), ist dieser Polymorphismus wie folgt lokalisiert (C59308T):

```
59281   TTGGCCCTGT   GACTATGGCT   CTGGCAC(C/T)AC   TAGGGTCCTG
GCCCTCTTCT TATTCATGCT
```

In Anhang 2 ist die vollständige genomische Sequenz aufgelistet.

Der Nachweis dieses Polymorphismus erfolgt durch dem Fachmann geläufige Methoden wie spezifische Hybridisierung, Sequenzierung, PCR- Reaktion mit anschließender Restriktionsanalyse, DNA - Chip- Technologie, single strand conformation polymorphism etc.. In einem beispielhaften Versuch erfolgte der Nachweis durch Amplifikation des entsprechenden Genabschnitts und anschließende Analyse des Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus, bei dem die Restriktionsenzyme *BanI*, *BshNI*, *Eco64I* oder deren Isoschizomere verwendet werden.

Als Ergebnis findet sich eine große Übereinstimmung zwischen dem Genotyp an Positionen 825 und 1429:

Genotyp an Position 825 der GNB3 cDNA	Genotyp TT bei Position 1429 der cDNA	Genotyp TC bei Position 1429 der cDNA	Genotyp CC bei Position 1429 der cDNA
TT 119	111 (93,3 %)	8 (6,7%)	0
TC 116	3 (2,6 %)	103 (88,8 %)	10 (8,6 %)
CC 124	0 (0 %)	2 (1,6 %)	122 (98,4 %)

Die neue Nukleinsäuresequenz kann zur Herstellung von Antisense-Arzneimitteln zur Therapie oder Prävention von Krankheiten dienen, wobei eine zu dieser Nukleinsäuresequenz komplementäre Nukleinsäuresequenz zur Herstellung des Antisense-Arzneimittels eingesetzt wird. Die Patienten können dabei z.B. mit Antisense-Oligonukleotiden oder Vektoren zur Verhinderung der Transkription oder Translation der G β 3-Untereinheit behandelt werden.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung von von β 3-Untereinheiten der G-Proteine zur Ermittlung des Risikos, an einer Krankheit, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Obwohl die G β 3s- Spleißvariante, die den Polymorphismus C1429T aufweist bzw. auf den Polymorphismus C825T zurückzuführen ist, in Kombination mit den G-Protein-Untereinheiten G α 12 und G γ 5 ein funktionelles Heterotrimer bilden kann, war es unklar, auf welche Weise G β 3s zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen führt.

Der Gegenstand der vorliegenden Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die Untereinheit G β 3s zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen führt. Der Nachweis der gesteigerten Aktivierbarkeit von G-Proteinen erfolgte über die Transfektion der entsprechenden cDNAs und Expression von G β 3 und G β 3s im dem Fachmann wohlbekannten COS-7- - Transfektionssystem. Hier zeigte sich, daß die Aktivierbarkeit

von G-Proteinen nach Transfektion von G β 3s gegenüber G β 3 deutlich gesteigert ist (Fig.1). Zur Quantifizierung der Aktivierbarkeit von G-Proteinen wurde hier der Einbau von radioaktiv markiertem [35S]GTP γ S in G-Protein α -Untereinheiten nach Stimulation mit dem Peptid Mastoparan-7 (Mas-7) gemessen.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich im Sf9-Insektenzellen-Expressionssystem erzielen (Fig.2). Hier wird der m2-muskarinerge Rezeptor zusammen mit den G-Protein-Untereinheiten G α i3 und G γ 5 und entweder G β 3 oder G β 3-s im Sf9-System exprimiert. Nach Stimulation mit dem Agonisten Carbachol werden in Gegenwart von G β 3-s eine gesteigerte Potenz und eine gesteigerte Effizienz des Agonisten Carbachol bezogen auf die Stimulierbarkeit von G-Proteinen beobachtet.

Diese Versuche zeigen, daß die Spleißvariante G β 3-s für eine gesteigerte Aktivierung von G-Proteinen ursächlich verantwortlich ist. Ferner beweisen diese Versuche, daß das Protein sich für eine Gentherapie für Krankheiten, die mit einer solchen G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind, im Sinne der Erzielung einer gesteigerten zellulären Reaktivität eignet.

Unter Krankheiten, die mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind, sind solche Erkrankungen zu verstehen, bei denen das G-Protein in der Signaltransduktion involviert ist und seine Funktion nicht in physiologischer Weise erfüllt. Die Fehlsteuerung kann eine Reihe von Ursachen haben, beispielsweise eine Veränderung im Strukturgen oder eine veränderte Genexpression. Die vorliegende Erfindung betrifft Krankheiten, die mit dem oben beschriebenen GNB3-825T-Allel bzw. GNB3-1429T-Allel assoziiert sind. Dazu zählen Diabetes mellitus (Typ-2), Übergewicht und Adipositas, koronare Herzkrankheit, Immunerkrankungen infolge einer verstärkten Funktion des Immunsystems, und Risikoschwangerschaften mit der Gefahr einer vorzeitigen Geburt (Frühgeburt).

Die folgenden Beispiele beziehen sich zwar auf Untersuchungen mit dem GNB3-825T-Allel. Aufgrund der großen Übereinstimmung (Kopplungsgleichgewicht) zwischen dem Genotyp an Positionen 825 und 1429 sind diese Beispiele und die aus den Versuchsergebnissen gezogenen Schlußfolgerungen für das GNB3-1429T-Allel ebenso gültig.

1. Vorhersage des Diabetes mellitus (Typ-2)

Der Typ-2-Diabetes (Synonyme: Altersdiabetes, nicht-Insulinpflichtiger Diabetes) ist eine schwerwiegende Erkrankung mit hoher kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität. Genetische Einflüsse und Übergewicht tragen wesentlich zur Pathogenese bei. Der Typ-2-Diabetes beginnt häufig als Insulinresistenz, welche zunächst durch eine gesteigerte Insulinsekretion kompensiert wird, so daß die betroffenen Individuen symptomlos (euglykämisch) bleiben. Erst wenn die gesteigerte Insulinsekretion nicht mehr aufrecht erhalten werden kann, kommt es zum Diabetes mit gesteigerten Blutzuckerspiegeln. Auf zellulärer Ebene können Veränderungen in Komponenten der Insulinsignaltransduktion, z.B. bei Insulin- Rezeptor- Substrat 1 (IRS-1), PI-3-Kinasen, Proteinkinasen, etc. eine Insulinresistenz bewirken. Aber auch nach einer Zellstimulation mit Agonisten (z.B. Angiotensin II), die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren, kann eine zelluläre Insulinresistenz herbeigeführt werden. Die Wirkung einer nachfolgenden Stimulation mit Insulin ist dann deutlich vermindert (Polonsky, K.S., Sturis, J., and Bell, G.I. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - A genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. N.Engl.J.Med. 334:777-783, 1996; O'Doherty, R., Stein, D., and Foley, J. Insulin resistance. Diabetologia 40 Suppl 3:B10-5:B10-5, 1997; Kahn, C.R., Vicent, D., and Doria, A. Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. Annu.Rev.Med. 47:509-531, 1996; Hansen, T., Andersen, C.B., Echwald, S.M., Urhammer, S.A., Clausen, J.O., Vestergaard, H., Owens, D., Hansen, L., and Pedersen, O. Identification of a

common amino acid polymorphism in the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase: effects on glucose disappearance constant, glucose effectiveness, and the insulin sensitivity index. Diabetes 46(3):494-501, 1997; Folli, F., Kahn, C.R., Hansen, H., Bouchie, J.L., and Feener, E.P. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels - A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. J.Clin.Invest. 100:2158-2169, 1997; Zhang, Y., Wat, N., Stratton, I.M., Warren-Perry, M.G., Orho, M., Groop, L., and Turner, R.C. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and b3-adrenergic receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gen mutations. Diabetologia 39:1505-1511, 1996; Almind, K., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Echwald, S., and Pedersen, O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 342:828-832, 1993; Laakso, M., Malkki, M., Kekäläinen, P., Kuusisto, J., and Deeb, S.S. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependent diabetes. J.Clin.Invest. 94:1141-1146, 1994).

Diese G-Protein-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von IRS-1 an Serinresiduen, wodurch die durch Insulin induzierte Phosphorylierung an Tyrosinresiduen reduziert wird. Als Folge davon kommt es zu einer reduzierten Interaktion von IRS-1 mit dem Insulinrezeptor und der PI-3-Kinase, d.h. zu einer verminderten Insulinwirkung. Eine gesteigerte Aktivierbarkeit von G-Proteinen, die durch das GNB3 825T-Allel und die damit verbundene Spleißvariante Gß3-s in vivo bewirkt wird, verstärkt die Neigung zur Insulinresistenz deutlich.

Es hat sich nun gezeigt, daß bei gleichzeitigem Vorliegen von Mutationen in Komponenten der Insulinsignaltransduktion (IRS1-Gen, 3931A-Variante; Gly971Arg; p85α- regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase (1020 G →A; Codon 326 Met →Ile;

β 3-adrenerger Rezeptor (Trp64Arg); β 2-adrenerger Rezeptor (hier insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante); Tumornekrosefaktor α ; Leptin oder der Leptinrezeptor), welche zur Insulinresistenz führen, und dem GNB3-825T-Allel, die Neigung zur Insulinresistenz und zum Diabetes drastisch ansteigt. Dieser Zusammenhang eröffnet die Möglichkeit, eine mit dem GNB3-825T-Allel assoziierte Diabetes mellitus vom Typ 2 zu diagnostizieren und eine derart genetisch bedingte Neigung zur Diabetes mellitus vom Typ 2 bei noch gesunden bzw. beschwerdefreien Personen vorherzusagen.

Zum Beweis wurde die DNA von über 700 Patienten mit Typ-2-Diabetes und von 1400 gesunden Kontrollpersonen gewonnen. Die Häufigkeiten des GNB3-825T-Allels und der IRS-1-Gly971Arg-Variante wurden verglichen. Tabelle I zeigt zunächst einen Vergleich der Allelfrequenzen bei Kontrollen und Fällen:

Tabelle I: Allelfrequenzen bei Kontrollen und Typ-2-Diabetikern

		Kontrollen			Diabetiker		
		Alle	Männer	Frauen	Alle	Männer	Frauen
Total, n		1464	962	502	720	320	400
Genotyp, n (%):							
GNB3	TT	116 (8)	83 (9)	33 (7)	61 (8)	32 (10)	29 (7)
	TC	585 (40)	360 (37)	225 (45)	345 (48)	161 (50)	184 (46)
	CC	763 (52)	519 (54)	244 (49)	314 (44)	127 (40)	187 (47)
	FT	0.28	0.27 ¹	0.29	0.32 ²	0.35 ²	0.30
IRS1	AA	5 (0)	4 (0)	1 (0)	8 (1)	4 (1)	4 (1)
	AG	159 (11)	108 (11)	51 (10)	108 (15)	58 (18)	50 (13)
	GG	1300 (89)	850 (88)	450 (90)	604 (84)	258 (81)	346 (87)
	FA	0.06	0.06	0.05	0.09 ¹	0.10 ²	0.07 ²
Alter (SD)		49 (10)	48 (10)	50 (9)	63 (9)	62 (9)	64 (9)
Alter bei Diagnose (SD)					46 (10)	45 (10)	47 (10)
BMI, kg / m ² (SD)		26.9 (3.9)	27.0 (3.4)	26.3 (4.8)	28.9 (4.8)	28.4 (4.4) ⁶	29.3 (5.0)
Nephropathy, n (%)					198 (31)	105 (36)	93 (28)
Hypertension, n (%)					464 (67)	181 (59)	283 (73)

Werte entsprechen n (%) für Allele und Diabetes-assoziierte Erkrankungen, und Mittelwerte (SD) für kontinuierliche Variablen. ¹, $p < 0.02$ ($\chi^2 = 8.1$) versus Kontrollfrauen; ², $p <$

0.001 ($\chi^2 = 14.4$) versus alle Kontrollen; ³, $p < 0.001$ ($\chi^2 = 20.0$) versus Kontrollmänner; ⁴, $p < 0.005$ ($\chi^2 = 12.9$) versus alle Kontrollen; ⁵, $p < 0.01$ ($\chi^2 = 13.2$) versus Kontrollmänner; ⁶, $p = 0.14$ ($\chi^2 = 3.1$) versus Kontrollfrauen.

Die folgenden Tabellen IIa und IIb zeigen das Risiko für Träger des GNB3-825T-Allels bzw. Träger des IRS1-3931A-Allels (einfache Effekte, Tabelle II.1) bzw. für Träger beider Allele (Kombinierte Effekte, Tabelle II.2), an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Das Risiko ist hier als altersadjustierte Odds Ratio ausgedrückt, wobei die Odds Ratio für Fall-Kontroll-Studien etwa dem relativen Risiko bei prospektiven Studien entspricht.

Tabelle II: Odds Ratios für Diabetes für Träger des GNB3-T825-Allels, des IRS1-A-3931 Allels oder beider Allele

Dargestellt sind altersadjustierte Odds ratios.

II.1 Einfache Effekte

Gene	Allele	Alle				Männer				Frauen			
		Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	Diab. (n)	OR (95% CI)	p-Wert
GNB3	TT/CC	116 / 763	61 / 314	1.25 / (0.81- 1.92)	0.3180	83 / 519	32 / 127	1.44 / (0.83- 2.51)	0.2002	33 / 244	29 / 187	1.22 / (0.60 - 2.46)	0.5882
GNB3	TC/CC	585 / 763	345 / 314	1.48 / (1.17- 1.87)	0.0011	360 / 519	161 / 127	1.86 / (1.35- 2.57)	0.0002	225 / 244	184 / 187	1.12 / (0.79 - 1.58)	0.5351
GNB3	TT + TC/CC	701 / 763	406 / 314	1.44 / (1.15- 1.80)	0.0015	443 / 519	193 / 127	1.78 / (1.31- 2.43)	0.003	258 / 244	213 / 187	1.13 / (0.80- 1.58)	0.4834
IRS1	AA/GG	5 / 1300	8 / 604	2.26 / (0.53- 9.59)	0.2686	4 / 850	4 / 285	1.71 / (0.32- 9.12)	0.5300	1 / 450	4 / 346	6.74 / (0.42- 109.57)	0.1797
IRS1	AG/GG	59 / 1300	108 / 604	1.35 / (0.97- 1.89)	0.0802	108 / 850	58 / 258	1.76 / (1.14- 2.69)	0.0100	51 / 450	50 / 346	0.99 / (0.57- 1.72)	0.9762
IRS1	AA + AG/GG	164 / 1300	116 / 604	1.38 / (1.00- 1.92)	0.0531	112 / 850	62 / 258	1.75 / (1.15- 2.67)	0.0086	52 / 450	54 / 346	1.07 / (0.62- 1.83)	0.8122

Tabelle II: Odds Ratios für Diabetes für Träger des GNB3-T825-Allels, des IRS1-A-3931 Allels oder beider Allele

Dargestellt sind altersadjustierte Odds ratios.

II.2 Kombinierte Effekte

Gene	Allele	Alle				Männer				Frauen			
		Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert	Kontr. (n)	DIAB. (n)	OR (95% CI)	p-Wert
GNB3 (IRS1 GG)	TT / CC	106 / 684	50 / 264	1.13 / (0.70-1.81)	0.6156	75 / 461	25 / 104	1.31 / (0.71-2.42)	0.3926	31 / 223	25 / 160	1.09 / (0.52-2.32)	0.8157
GNB3 (IRS1 GG)	TC / CC	510 / 684	290 / 264	1.53 / (1.19-1.96)	0.0010	314 / 461	129 / 104	1.90 / (1.33-2.70)	0.0004	196 / 223	161 / 160	1.19 / (0.82-1.72)	0.3600
GNB3 (IRS1 GG)	TT+TC/ CC	616 / 684	340 / 264	1.46 / (1.15-1.86)	0.0022	389 / 461	154 / 104	1.78 / (1.27-2.50)	0.0008	227 / 223	186 / 160	1.18 / (0.82-1.68)	0.3743
IRS1 (GNB3 CC)	AA + AG / GG	79 / 684	50 / 264	1.48 / (0.90-2.43)	0.1198	58 / 461	23 / 104	1.78 / (0.93-3.38)	0.0782	21 / 223	27 / 160	1.33 / (0.59-3.00)	0.4984
IRS1 + GNB3	TT + AA or AG / CC + GG	10 / 684	11 / 264	3.38 / (1.13-10.08)	0.0291	8 / 461	7 / 104	4.03 / (1.12-14.56)	0.0333	2 / 223	4 / 160	3.39 / (0.49-31.60)	0.1975
IRS1 + (GNB3)	TC + AA or AG / CC + GG	75 / 684	55 / 264	1.69 / (1.05-2.73)	0.0311	43 / 461	32 / 104	2.82 / (1.52-5.23)	0.0010	28 / 223	23 / 160	0.89 / (0.41-1.93)	0.7706
IRS1 + GNB3	TC or TT + AA or AG / CC + GG	85 / 684	66 / 264	1.87 / (1.19-2.92)	0.0062	54 / 461	39 / 104	2.99 / (1.69-5.30)	0.0002	31 / 223	27 / 160	1.05 / (0.51-2.17)	0.8959

Man erkennt eine deutliche Risikosteigerung für den Typ-2-Diabetes für Träger des GNB3-825T-Allels bzw. Träger des IRS1-3931A-Allels (Tabellen II.1 und II.2). Eine drastische Risikosteigerung findet man bei Individuen, bei denen beide Gene verändert sind. Somit kann der Nachweis des GNB3-825T-Allels dazu dienen, bei den betroffenen Personen die Neigung für eine Erkrankung an Typ-2-Diabetes festzustellen bzw. eine genetisch bedingte Ursache einer bereits aufgetretenen Erkrankung zu ermitteln.

2. Vorhersage von Adipositas/Übergewicht

Die Regulation des Body Mass Index (BMI), ein Maß für das Verhältnis von Körpergewicht zu Körpergröße, wird durch viele Gene bestimmt. Übergewicht ist zu etwa 40% genetisch bedingt, wird aber auch durch überhöhte Kalorienzufuhr bei bestehendem Bewegungsmangel verursacht. Die G β 3-s Spleißvariante ist mit dem zellulären Phänotyp eines gesteigerten Zellwachstums verbunden. Damit ist es auch möglich, daß das GNB3-825T-Allel zu einem gesteigerten Körperwachstum, u.a. Übergewicht, prädisponiert, und epi- und hypostatische Effekte ausüben kann. Dabei kann ebenso wie beim Diabetes mellitus (Typ 2) ein Zusammenhang bestehen mit Veränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im Gen, das für den β 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg-Variante) und im Gen, das für den β 2-adrenergen Rezeptor kodiert, hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante.

Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigten, daß das Fehlen des Gens, welches für das IRS-1-Protein kodiert, im Gegensatz dazu zu einer starken Verzögerung des Körperwachstums führt (Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S., Sekihara, H., Yoshioka, S., Horikoshi, H., Furuta, Y., Ikawa, Y., Kasuga, M., Yazaki, Y., and Aizawa, S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372:182-186, 1994).

Um die Korrelation von Adipositas mit dem Vorliegen des GNB3-825-Nukleotids und der Status des IRS1-Gens bezüglich des Vorliegens der Gly971Arg-Variante zu überprüfen, wurde der BMI bei 20-30-jährigen gesunden Männern, bei denen gleichzeitig der Status des GNB3-825-Nukleotids und der Status des IRS1-Gens bezüglich des Vorliegens der Gly971Arg-Variante untersucht wurde, gemessen. Das Ergebnis ist in Figur 3 dargestellt.

Fig. 3 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Werte für den BMI. Bei Vorliegen des häufigeren IRS1-"GG"-Genotyps läßt sich mit dem GNB3-825T-Allel im Vergleich zum GNB3-C825-Allel eine signifikante Tendenz zu erhöhtem BMI nachweisen. Die Odds Ratio für das 75%-Quartil gegenüber dem 25 % Quartil beträgt 2,5. Dagegen wird der Neigung zu gesteigertem BMI bei Trägern des GNB3-825T-Allels bei gleichzeitiger Anwesenheit des IRS1-3931A-Allels (Gly971Arg-Variante) deutlich entgegengewirkt. Dies illustriert den interaktiven Effekt von GNB3 und IRS1 auf den BMI. Somit läßt sich das Vorliegen des GNB3-825T-Allel zuverlässig mit Adipositas korrelieren. Damit ist es möglich, eine Neigung zu Adipositas bei Trägern dieses Allels, insbesondere solchen, denen gleichzeitig das IRS1-3931A-Allel (Gly971Arg-Variante) fehlt, vorherzusagen.

825T-Allelträger weisen, wie z.B. in der DE 196 19 362 A1 beschrieben, ein erhöhtes Risiko auf, an einer Hypertonie zu erkranken. Da Übergewicht und Adipositas in sehr starkem Maße für kardiovaskuläre Erkrankungen prädisponieren, wurde untersucht, ob junge Personen mit normalem Blutdruck, die ein 825T-Allel tragen, bereits ein erhöhtes Risiko für Übergewicht und Adipositas aufweisen. Dazu wurde bei 277 jungen, normotensiven Männern die Körpergröße und das Körpergewicht bestimmt und der Blutdruck gemessen. Übergewicht wird als ein $BMI \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ definiert und Adipositas als $\geq 27,0 \text{ kg/m}^2$. Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen BMI und Blutdruckwerten. Die Frequenz des 825T-Allels steigt über vom 1. zum 4. BMI-Quartil linear an. Für homozygote 825T-

Allelträger lassen sich die folgenden Risiken (odds ratios; OR) berechnen

a) BMI $\geq 25,0$ kg/m² versus BMI < 25 kg/m² (Übergewicht versus Normalgewicht):

OR TT/CC = 2,5 (1,1 - 6,1; p = 0,03); OR TC/CC 1,5 (0,8 - 2,6; p = 0,2)

b) BMI > 27 kg/m² versus BMI < 25 kg/m² (Adipositas versus Normalgewicht):

OR TT/CC = 5,0 (1,4 - 18,3; p = 0,0083); OR TC/CC = 2,2 (0,8 - 6,3; p = 0,13).

Somit ergibt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Vorhandensein eines 825T-Allels und der Neigung zu Übergewicht und Adipositas. Dies erklärt unter anderem zum Teil das erhöhte Risiko von 825T-Allelträgern für Hypercholesterämie, Diabetes, Hypertonie und koronare Herzkrankheit/Myokardinfarkt.

GNB3 825T - Allel, BMI und Blutdruckwerte

		BMI Quartile				
GNB3	Alle	1 < 21.7	2 21.7 - 23.4	3 23.4 - 25.0	4 ≥ 25.0	> 27 kg/m ²
TT	28 (10)	2 (3)	6 (8)	9 (13)	11 (16)	5 (23)
TC	121 (44)	27 (39)	27 (40)	34 (49)	33 (47)	11 (50)
CC	128 (46)	40 (58)	36 (52)	26 (38)	26 (37)	6 (27)
Σ	277	69	69	69	70	22
fT (%)	31.9	22.5	28.3	37.7	39.3	47.7
Alter (Jahre)	25.6 (3.4)	24.8 (3.6)	25.6 (3.2)	25.3 (3.4)	26.4 (2.9)	26.5 (2.9)
Größe (cm)	180.4 (7.3)	180.8 (6.4)	180.5 (7.4)	180.7 (7.1)	179.6 (7.4)	181.0 (5.9)

16

Gewicht (kg)	76.5 (9.8)	67.4 (5.2)	73.1 (6.3)	78.9 (7.1)	86.2 (8.7)	93.5 (6.9)
BP syst (mm Hg)	129.8 (11.1)	126.3 (9.1)	130.2 (9.4)	130 (11.8)	133 (12.9)	135.9 (10.7)
BP diast (mm Hg)	79.1 (7.9)	75.8 (7.9)	79.4 (5.5)	79.7 (7.3)	81.9 (9.2)	84.3 (9.8)

Genotypen sind als n (%) angegeben und kontinuierliche Variablen als Mittelwerte (Standardabweichung); fT = 825T Allelfrequenz; BMI (body mass index) ist als kg/m² angegeben. BP syst = systolischer Blutdruck; BP diast = diastolischer Blutdruck.

3. Vorhersage von koronarer Herzkrankheit und Atherosklerose

Es ist bereits bekannt, daß koronare Herzkrankheit mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sein können. Um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit und dem Vorhandensein des GNB3-825T-Allels zu überprüfen, wurden Patienten mit angiographisch ausgeschlossener koronarer Herzkrankheit, mit koronarer Herzkrankheit (ohne Myokardinfarkt), mit einem Myokardinfarkt und mit mehr als einem Myokardinfarkt auf das Vorhandensein dieses Alles überprüft. Das Ergebnis ist in Fig. 4 dargestellt.

Fig. 4 zeigt die Frequenz des GNB3-825T-Allels bei Patienten mit angiographisch ausgeschlossener koronarer Herzkrankheit (KHK), mit KHK (ohne Myokardinfarkt; MI), mit einem Myokardinfarkt (MI) und mit mehr als einem Myokardinfarkt.

Man erkennt einen deutlichen Anstieg der Frequenz des GNB3-825T-Allels bei KHK und MI. Das Risiko für KHK und MI wird durch das GNB3-825T-Allel gegenüber Kontrollen ohne KHK etwa verdoppelt.

Patienten mit Mutation im IRS-1 Protein (3931A-Allel; Gly971Arg-Variante) erfahren jedoch eine deutliche

Risikoreduktion um bis zu 50 % bei Vorliegen des GNB3-C825- oder des GNB3-825T-Allels. Diese Veränderung im IRS-1-Protein übt also hypostatische Effekte aus, d.h. diese Variante schützt vor koronarer Herzkrankheit.

Vergleicht man Patienten mit KHK mit Individuen mit koronarangiographisch ausgeschlossener KHK, so ergeben sich die folgenden Odds Ratios:

KHK positiv	KHK negativ	OR	P - Wert
GNB3 + IRS1-Status	GNB3 + IRS1-Status		
TT/TC + AG/AA	TT/TC + GG	0.94	Nicht signifikant
TT/TC + GG	CC + GG	1,4	0,003
TT/TC + GG	CC + AG/AA	2,8	0,002

Damit ist eine Korrelation zwischen dem Vorliegen des GNB3-825T-Allels mit dem Auftreten koronarer Herzkrankheit belegt. Somit ist es möglich, eine Neigung zu koronarer Herzkrankheit bei Trägern dieses Allels, insbesondere solchen, denen gleichzeitig das IRS1-3931A-Allel (Gly971Arg-Variante) fehlt, vorherzusagen.

Ein besonderer Anwendungsbereich ist die Vorhersage einer koronaren Herzkrankheit, aber auch allgemein des kardiovaskulären Risikos (Bluthochdruck, usw.) bei Frauen, mit dem Ziel, diese einer gezielten, post-menopausalen Hormontherapie mit weiblichen Sexualhormonen zuzuführen, um das kardiovaskuläre Risiko zu vermindern.

Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Vorhersage eines erhöhten Risikos für Myokardinfarkte und plötzlichen Herztod. Dies hängt u.a. damit zusammen, daß G-Proteine auch Ionenkanäle steuern. Genauer gesagt, steuern die G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen die Funktion vielfältiger Ionenkanäle, z.B. von Na⁺-Kanälen, Ca²⁺-Kanälen und K⁺-Kanälen. Eine genau abgestimmte Regulation solcher Ionenkanäle ist für alle elektrisch erregbaren Gewebe von großer Wichtigkeit, insbesondere für das

Herz (De Waard, M., Liu, H., Walker, D., Scott, V.E., Gurnett, C.A., and Campbell, K.P. Direct binding of G-protein $\beta\gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature* 385(6615):446-450, 1997; Ma, J.Y., Catterall, W.A., and Scheuer, T. Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Neuron* 19(2):443-452, 1997; Kofuji, P., Davidson, N., and Lester, H.A. Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K^+ channels are activated by $G\beta\gamma$ subunits and function as heteromultimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:6542-6546, 1995; Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E. $G\beta\gamma$ binds directly to the G protein-gated K^+ channel, I_{KACH} . *J.Biol.Chem.* 270:29059-29062, 1995).

Es hat sich gezeigt, daß Personen, die das GNB3-T825-Allel tragen, eine verstärkte Aktivität myokardialer K^+ - Kanäle zeigen. Dies führt zu einer beschleunigten Repolarisation der Herzmuskelzelle, und damit zu einer verkürzten Refraktärzeit. Diese Personen unterliegen damit einem erhöhten Risiko für Herzrhythmusstörungen, insbesondere ventrikuläre Tachykardien, Extrasystolen, Kammerflattern und Kammerflimmern. Sie tragen ein verstärktes Risiko für einen plötzlichen Herztod auch im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts.

Schließlich zeigen Träger des GNB3-825T-Allels bereits im Alter von 20 - 30 Jahren deutliche Veränderungen der Eigenschaften von Blutgefäßen. Besonders auffällig sind eine erhöhte Pulswellengeschwindigkeit, ein gesteigertes Schlagvolumen des Herzens und ein erhöhter Pulsdruck. Diese Phänomene sind Ausdruck einer früh einsetzenden Neigung zu einer erhöhten Steife der Blutgefäße (verminderte Compliance) als Indikator für eine Atherosklerose. Die Genotypisierung zur Feststellung des GNB3-C825T-Allelstatus ist damit geeignet, ein erhöhtes Risiko für die Atherosklerose festzustellen.

4. Vorhersage einer erhöhten Cholesterinkonzentration im Blut

Es ist allgemein bekannt, daß Menschen mit erhöhter Konzentration des Gesamtcholesterin im Blut ein erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheit und Herzinfarkt zuzuordnen ist. Es wurden 232 Personen im Alter von 18 - 40 Jahren bezüglich des C825T - Polymorphismus in GNB3 genotypisiert und das Gesamtcholesterin im Serum wurde mittels Standardmethodik quantifiziert. Nachfolgend wurden die gemessenen Cholesterinkonzentrationen (mg/dl) in Quartile aufgeteilt, und der Genotyp am GNB3 - Locus wurde den Quartilen zugeordnet. Die niedrigste Frequenz des 825T-Allels findet sich mit 23,3 % im 1. Quartil, während die Frequenz des 825T-Allels in den Quartilen 2-4 deutlich höher liegt.

	Cholesterinkonzentration			
	1. Quartil - 163 mg/dl	2. Quartil - 181 mg/dl	3. Quartil - 212 mg /dl	4. Quartil > 212 mg/dl
TT	4 (9)	4 (8)	12 (17)	7 (12)
TC	13 (29)	21 (44)	32 (46)	28 (47)
CC	28 (62)	23 (48)	26 (37)	24 (41)
ft	23,3 %	30,2 %	40,0 %	35,6 %

Die Zahlen entsprechen n (%)

Vergleicht man die Genotypverteilung oberhalb des Medianwertes (> 181 mg/dl; TT = 19; TC = 60; CC = 50; Frequenz des 825T-Allels: 38 %) mit der unterhalb des Medianwertes (≤ 181 mg/dl; TT = 8; TC = 34; CC = 51; Frequenz des 825T-Allels: 26,9 %), so errechnen sich die folgenden Risiken für Cholesterinwerte im Bereich oberhalb des Medians :

Odds ratio TT/CC = 2,4 ($p = 0,053$); odds ratio TC/CC = 1,8 ($p < 0.05$)

Damit ist das 825T- Allel mit einem erhöhten Risiko für eine Hypercholesterinämie verbunden.

Eine Genotypisierung am GNB3-Locus bietet also die Möglichkeit zur Feststellung eines erhöhten Risikos für eine Hypercholesterinämie und mit dem Ziel, betroffene Personen mit Pharmaka zu behandeln, die das erhöhte Cholesterin senken können. Dazu gehören insbesondere Hemmstoffe des Enzyms 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), z.B. Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Atorvastatin und weitere sog. "Statine". Dazu gehören auch β -Sitosterin, Sitostanol-Ester (auch in Lebensmitteln), Fibrate und weitere Substanzen, die das Cholesterin senken.

Die genannten Pharmaka wirken hierbei auch als G-Protein Hemmer und lassen sich somit bei mit einer G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten therapeutisch einsetzen.

5. Vorhersage einer verstärkten Funktion des Immunsystems

G-Proteine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren finden sich auch in allen Zellen des Immunsystems, insbesondere auch in Leukozyten. Chemotaxis von Zellen wird vorwiegend durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine vermittelt. Damit sollte auch das GNB3-825T-Allel zu einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems, insbesondere zu einer verstärkten Immunabwehr führen.

In der Tat weisen neutrophile Granulozyten von Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte Chemotaxis gegenüber dem Peptid fMLP auf (Fig.5). fMLP ist ein Peptid, welches für eine Vielzahl von bakteriellen Peptiden repräsentativ ist und chemotaktische Reaktionen stimuliert. Es dient daher als Testsystem für die Messung chemotaktischer Reaktionen von Zellen, welches dem Fachmann wohlbekannt ist. Der fMLP-Rezeptor aktiviert bekanntlich Pertussistoxin-sensitive G-Proteine. Die

Feststellung, daß Granulozyten von Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte fMLP-stimulierte Chemotaxis zeigen, steht in Einklang mit der Tatsache, daß die Chemotaxis von $\beta\gamma$ -Untereinheiten vermittelt wird.

Dieses Phänomen läßt sich auch in anderen Leukozyten, z.B. Lymphozyten, nachweisen. Somit besteht eine Korrelation zwischen dem GNB3-825T- Allel und einer gesteigerten Chemotaxis von Zellen des Immunsystems, z.B. von neutrophilen Granulozyten, T- Lymphozyten, siehe auch 6., oder B-Lymphozyten.

Ferner beobachtet man bei Trägern des GNB3-825T-Allels eine verstärkte Proliferationsneigung von Zellen des Immunsystems, besonders auch nach Impfungen.

Gesunde Träger des GNB3-825T-Allels zeigen eine erhöhte Anzahl von Leukozyten und von CD4-positiven T-Lymphozyten (absolut und prozentual) mit gesteigertem CD4/CD8 - Quotienten. Fig.6 zeigt dies für die erhöhte Zahl von CD4 - Lymphozyten. Umgekehrt zeigen Träger des GNB3-825T-Allels zeigen auch eine verstärkte Neigung, nach einer HIV-Infektion an AIDS zu erkranken, siehe auch 7., auch im Zusammenhang mit dem Nachweis der oben beschriebenen Genveränderung in Chemokinrezeptoren, insbesondere einer $\Delta 32$ - Deletion im CCR5- Rezeptor oder im Bereich des Promotors dieses Gens.

Schließlich beobachtet man bei betroffenen Personen eine verstärkte Freisetzung von immunmodulatorischen Substanzen, Hormonen und anderen Substanzen aus Leukozyten (Zytokine, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Antikörper, gefäßwirksame Substanzen). In diesem Zusammenhang resultiert auch eine verstärkte Immunabwehr nach Transplantation von Organen oder Geweben (Niere, Herz, Knochenmark, Lunge, Haut, Leber etc.) mit der Gefahr der Transplantatabstossung. Außerdem folgt daraus eine verstärkte Neigung zu Autoimmunerkrankungen (Rheuma,

Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) und zu allergischen Erkrankungen, z.B. der Haut, der Atemwege oder anderer Organe (z.B. Neurodermitis, Heuschnupfen, Asthma bronchiale). Dies beobachtet man auch in Kombination mit dem Nachweis anderer Genveränderungen, z.B. im $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor, hier insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante.

6. Vorhersage einer gesteigerten Funktion von T-Lymphozyten

T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle im menschlichen Immunsystem und vermitteln dort die zelluläre Immunantwort. Eine gesteigerte Aktivierbarkeit von T-Lymphozyten hat unter anderem zur Folge, wie bereits erwähnt, daß transplantierte Organe (Niere, Leber, Herz, Lunge, Pankreas u.a.) einer verstärkten immunologischen Attacke unterliegen. In Fig. 7 ist als ein Beispiel die Chemotaxis menschlicher T-Lymphozyten nach Stimulation mit Stromal Cell-derived Factor 1 α (SDF 1 α) dargestellt. Man erkennt eine deutlich gesteigerte chemotaktische Antwort der Zellen von 825T - Allelträgern im Vergleich zu Zellen von homozygoten C825-Allelträgern.

In ähnlicher Weise antworten T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern verstärkt nach Stimulation mit anderen Chemokinen, z.B. RANTES. Dieses Verhalten erklärt sich daraus, daß die chemotaktische Antwort wesentlich von betagamma - Untereinheiten heterotrimerer G- Proteine gesteuert wird (Arai, H., Tsou, C.L., and Charo, I.F. Chemotaxis in a lymphocyte cell line transfected with C-C chemokine receptor 2B: Evidence that directed migration is mediated by betagamma dimers released by activation of G α phai-coupled receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94(26):14495-14499, 1997).

Die verstärkte Aktivierung von T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern äußert sich auch in einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen im Vergleich zu T-Lymphozyten von homozygoten C825 Allelträgern.

Somit läßt sich insgesamt vorhersagen, daß die T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern auf geeignete Stimulation stärker reagieren, was sich in einer gesteigerten Proliferation und Chemotaxis äußert. Dieses Verhalten manifestiert sich in Form einer gesteigerten zellulären Immunabwehr, was insbesondere bei Erkrankungen und operativen Eingriffen relevant ist, bei denen eine gesteigerte zelluläre Immunabwehr vorliegt. Zu nennen ist hier besonders die immunologische Attacke von transplantierten Organen (Niere, Leber, Pankreas, Knochenmark, Herz, etc.). Es läßt sich damit vorhersagen, daß 825T-Allelträger vermehrt dazu neigen, gegen solche transplantierten Organe eine akute oder chronische Abstossungsreaktion zu entwickeln. Diese Abstossungsreaktion wird weiter verstärkt, falls die transplantierten Organe von einem Spender stammen, der selbst Träger eines 825T-Allels ist. Dies erklärt sich damit, daß Organe und Gewebe solcher Spender auf die gesteigerte immunologische Attacke durch Zellen des Empfängers bei Vorhandensein eines 825T-Allels verstärkt reagieren. Ferner findet sich eine verstärkte Reaktion bei akuten oder chronischen Virusinfektionen.

7. Vorhersage einer verstärkten Progression von AIDS

Die Vermehrung des HIV-Virus in T-Lymphozyten wird durch eine Aktivierung von Chemokinrezeptoren, deren Wirkung über die Aktivierung von G-Proteinen vermittelt wird, gesteigert (Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(20):11880-11885, 1998).

Damit ist zu erwarten, daß in T-Lymphozyten von 825T-Allelträgern, die eine gesteigerte Aktivierbarkeit von G-Proteinen aufweisen, nach HIV-Infektion eine verstärkte Virusvermehrung stattfindet. Somit haben diese Patienten ein erhöhtes Risiko, nach HIV-Infektion früher an AIDS zu erkranken

als HIV-positive Patienten, die homozygot für das C825-Allel am GNB3-Locus sind. Nachfolgend ist die Genotypverteilung von 515 HIV-positiven Patienten und von 622 HIV-negativen Blutspendern dargestellt.

	HIV positiv	HIV negativ
TT	64	56
TC	235	276
CC	216	290
Summe	515	622
T-Allelfrequenz	35,2 %	31,2 %

Es findet sich ein signifikanter Unterschied der Genotypverteilung zwischen gesunden Kontrollprobanden und HIV-positiven Personen (chi quadrat = 4.253, 1 Freiheitsgrad, $p = 0.0392$; chi-square test for trend). Das Risiko für den TT-versus den CC-Genotyp, HIV-positiv zu sein beträgt damit 1,5 (1,0 - 2,3; $p = 0.035$; chi-Quadrat = 4.4).

Es findet sich eine weitere Akkumulation des 825T-Allels innerhalb der Gruppe von HIV-positiven Patienten die an AIDS erkrankt sind, bzw. deren Anzahl CD4-positiver Zellen unter 200 pro μl Blut abgesunken ist.

	HIV positiv, CD4 < 200 Zellen/ μl Blut	HIV positiv, CD4 \geq 200 Zellen / μl Blut
TT	40	14
TC	122	89
CC	113	80
Summe	275	183
T-Allelfrequenz	36,7 %	32 %

Damit besteht bei HIV-positiven Patienten, die ein 825T-Allel tragen, ein erhöhtes Risiko, an AIDS zu erkranken. Für homozygote 825T-Allelträger ist das Risiko gegenüber homozygoten C825-Allelträgern 2-fach erhöht (OR TT/CC = 2,0 (1,0 - 3,9; $p < 0,05$)).

Eine Genotypisierung am GNB3-Locus bietet also die Möglichkeit, daß HIV-positiven 825T-Allelträgern ein erhöhtes Risiko zugeordnet wird, eine verstärkte Progression der Erkrankung zu zeigen, wobei es insbesondere zu einer verstärkten Vermehrung des AIDS-Virus kommt. Ferner ist das Risiko eines schnelleren Absinkens der CD4-Zellen damit verbunden.

Im Rahmen der Infektion mit dem HIV-Virus (sexueller Übertragungsweg) kommt es zumeist zunächst zum Befall von Makrophagen, Monozyten und Langerhanszellen. Die sogenannten "M-tropen" "R5" HIV-Viren benutzen zum Eintritt in diese Zellen u.a. einen Chemokinrezeptor vom Typ CCR5. Individuen, bei denen eine homozygote CCR5Δ32-Deletion nachzuweisen ist, haben ein vermindertes Risiko für eine HIV-Infektion. Personen, bei denen das CCR5Δ32-Allel in heterozygoter Form vorliegt, zeigen einen verlängerten Zeitraum von der HIV-Infektion bis zur Serokonversion, bzw. eine verzögerte Progression der Erkrankung. (1. Quillent, C., Oberlin, E., Braun, J., Rousset, D., Gonzalez-Canali, G., Metais, P., Montagnier, L., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Beretta, A. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 351(9095):14-18, 1998; 2. Mummidi, S., Ahuja, S.S., Gonzalez, E., Anderson, S.A., Santiago, E.N., Stephan, K.T., Craig, F.E., O'Connell, P., Tryon, V., Clark, R.A., Dolan, M.J., and Ahuja, S.K. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat.Med.* 4(7):786-793, 1998; 3. Magierowska, M., Theodorou, I., Debre, P., Sanson, F., Autran, B., Riviere, Y., Charron, D., and Costagliola, D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1- infected individuals. *Blood* 93(3):936-941, 1999; 4. Michael, N.L., Louie, L.G., Rohrbaugh, A.L., Schultz, K.A., Dayhoff, D.E., Wang, C.E., and Sheppard, H.W. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression [see comments]. *Nat.Med.*

3(10):1160-1162, 1997; 5. Fauci, A.S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 384:529-534, 1996.)

Im Gegensatz dazu verstärkt die Gegenwart einer Variante im CCR5-Promoter (CCR5P1) die AIDS-Progression, insbesondere bei homozygoten CCR5P1-Trägern. (Martin, M.P., Dean, M., Smith, M.W., Winkler, C., Gerrard, B., Michael, N.L., Lee, B., Doms, R.W., Margolick, J., Buchbinder, S., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Hilgartner, M.W., Vlahov, D., O'Brien, S.J., and Carrington, M. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282(5395):1907-1911, 1998.)

Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu Veränderung der Virusart in der Weise, daß die sogenannten "T-tropen" (X4)-Viren überwiegen, welche dann vorwiegend CD4-positive T-Lymphozyten befallen. Der Eintritt dieser Viren erfolgt über den G-Protein- gekoppelten CXCR4 - Chemokinrezeptor, zu dessen natürlichen Liganden u.a. Stromal Cell Derived Factor 1 alpha (SDF-1 α) gehört. Eine Reihe von Chemokinen (SDF-1 α , RANTES, etc.) stimulieren die Vermehrung von T-tropen Viren in CD4-positiven T-Zellen, wobei der Signalübertragung über Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen eine entscheidende Bedeutung zukommt: Eine Hemmung der G-Proteinaktivierung durch Inkubation von Zellen mit Pertussistoxin reduziert die Virusvermehrung insbesondere bei niedriger Viruszahl. (Kinter, A., Catanzaro, A., Monaco, J., Ruiz, M., Justement, J., Moir, S., Arthos, J., Oliva, A., Ehler, L., Mizell, S., Jackson, R., Ostrowski, M., Hoxie, J., Offord, R., and Fauci, A.S. CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95(20):11880-11885, 1998.)

Umgekehrt läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß bei Vorliegen eines 825T-Allels, welches die Expression von G β 3-s und G β 3-s2 und eine verstärkte Aktivierbarkeit von G-Proteinen anzeigt, die Vermehrung solcher Viren und damit die AIDS - Progression gesteigert sein sollten.

Eine Veränderung im Gen, welches für SDF-1 kodiert (G→A - Transition bei Position 801, gezählt vom Startkodon) wird als SDF1-3'UTR-801G-A oder als SDF1-3'A bezeichnet. Homozygote SDF1-3'A zeigen eine verminderte Progression zu AIDS. (Winkler, C., Modi, W., Smith, M.W., Nelson, G.W., Wu, X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., and O'Brien, S.J. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC) [see comments]. *Science* 279(5349):389-393, 1998.)

Zum Nachweis einer verstärkten AIDS-Progression von 825T-Allelträgern wurden 690 HIV-positive, homo- und heterosexuelle Personen (Männer und Frauen) untersucht, bei den das HIV-Virus auf sexuellem Wege übertragen wurde. Nach Genotypisierung wurden die folgenden Endpunkte der Erkrankung festgelegt, die eine mögliche Definition der Erkrankung an AIDS darstellen:

1. AIDS. Hierbei ist AIDS definiert als AIDS- definierende Erkrankung oder CD4 -Zellzahl < 200. Diese AIDS - Definition entspricht der 1993 vom Center for Disease Control (CDC; Atlanta, USA) revidierten AIDS- Definition.
2. CD4 - Zellzahl < 200
3. Minimale CD4-Zellzahl
4. Maximale Viruslast

In Fig. 9 ist der Zeitpunkt vom ersten positiven HIV-Test bis zur AIDS- Diagnose als Kaplan- Meier- Kurven in Abhängigkeit vom Genotyp dargestellt. Fig. 9 zeigt, daß homozygote 825T-Allelträger den Endpunkt AIDS gemäß der CDC - Definition von 1993 signifikant früher erreichen, als homozygote oder heterozygote 825C-Allelträger.

Fig. 10 zeigt den Zeitraum zwischen erstem positiven HIV - Test und Absinken der CD4-Zellzahl unter 200. Hier ist der Zeitverlauf für homozygote 825T-Allelträger gegenüber homo- und heterozygoten C825-Allelträgern ebenfalls drastisch beschleunigt.

Fig. 11 zeigt den Zeitverlauf von erstem positivem HIV - Test und individuell niedrigster CD4-Zellzahl. Hier ergibt sich ebenfalls eine signifikante Beschleunigung bei homozygoten 825T-Allelträgern gegenüber homo- und heterozygoten C825-Allelträgern.

In Fig. 12 ist der Zeitraum zwischen erstem positiven HIV-Test und maximaler Viruslast dargestellt. Wiederum zeigt sich, daß 825T-Allelträger ein deutlich erhöhtes Risiko aufweisen, früher eine maximale Viruslast aufzuweisen als homo- oder heterozygote C825-Allelträger.

7.1 Korrelation zum CCR5-Allelstatus

Nachfolgend wurde zusätzlich der CCR5-Allelstatus bezüglich des Vorhandenseins der $\Delta 32$ -Deletion untersucht. Die in der nachfolgenden Tabelle dargestellten relativen Risiken (RH) werden zusammen mit den 95 % Konfidenzintervallen (95 % CI) dargestellt.

Ohne Beachtung des genetischen Hintergrunds ist das Risiko für AIDS oder Absinken der CD4-Zellzahl < 200 für homozygote 825T-Allelträger gegenüber homo- und heterozygoten C825-Allelträgern etwa verdoppelt. Ohne Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes findet man ein 1,4-fach erhöhtes Risiko für CCR5 $\Delta 32$ -Allelträger im Beobachtungszeitraum eine CD4-Zellzahl < 200 zu erreichen. Nachfolgend wird der Einfluß des 825T-Allels für CCR5-Wildtyp und für CCR5 $\Delta 32$ getrennt untersucht. Bei Vorhandensein des homozygoten CCR5-Wildtyp beträgt das Risiko

für AIDS oder CD4-Zellzahl < 200 für homozygote 825T-Allelträger gegenüber heterozygoten C825-Allelträgern etwa 1,6.

Bei Vorhandensein des CCR5Δ32 Genotyps, welcher ursprünglich als protektiv beschrieben wurde, findet man jedoch für homozygote 825T-Allelträger eine weitere Erhöhung des Risikos auf nahezu das 3-fache gegenüber heterozygoten C825-Allelträgern.

Tabelle :
GNB3 825 Genotypstatus und CCR5 -Genotypstatus und AIDS-Progression
COX Proportional Hazard Modell:

Konstant	Zielgröße	Genstatus untersucht	RH	95% CI
nichts	AIDS	GNB3 TT versus TC+CC	1.9	(1.4-2.6)
	CD4 < 200	"	1.9	(1.4-2.6)
	CD4 min	"	1.5	(1.2-2.0)
	PCR max	"	1.5	(1.2-2.0)
nichts	AIDS	CCR5 WT versus CCR5Δ32	ns	
	CD4 < 200	"	1.4	(1.0-1.9)
	CD4 min	"	ns	
	PCR max	"	ns	
CCR 5 = WT	AIDS	GNB3 TT versus TC+CC	1.6	(1.1-2.3)
	CD4 < 200	"	1.6	(1.1-2.3)
	CD4 min	"	1.4	(1.1-1.9)
	PCR max	"	1.4	(1.0-1.9)
CCR5 Δ32	AIDS	GNB3 TT versus TC + CC	2.7	(1.3 - 5.5)
	CD4 < 200	"	3.0	(1.5-6.3)
	CD4 min	"	2.1	(1.1-3.8)
	PCR max	"	1.9	(1.0-3.4)

RH = relative hazard; 95% CI = 95 % Konfidenzintervall; GNB3 = G-Protein β3-Untereinheit; TT = Homozygot für 825T; TC und CC, hetero- oder homozygot für C825; CCR5 WT = CCR5-Wildtyp (Fehlen der Δ32-Deletion); PCR-max, Zeitraum bis zur maximalen Viruslast; AIDS, Zeitraum bis zum Eintritt von AIDS gemäß CDC-Definitio von 1993; ns = nicht signifikant

Es läßt sich daher zusammenfassend für HIV-positive Patienten feststellen:

1. Homozygotie für das 825T-Allel in GNB3 erhöht das Risiko für die Progression zu AIDS.
2. Dieser Effekt wird bei Vorliegen des CCR5Δ32-Genotyps weiter verstärkt.

8. Vorhersage einer erhöhten CO₂- bzw. Hypoxietoleranz

Bekanntlich sind G-Proteine auch an der Regulation des Atemantriebs durch Hypoxie bzw. Hyperkapnie beteiligt (Prabhakar, N.R., Kou, Y.R., and Kumar, G.K. G proteins in carotid body chemoreception. Biol.Signals 4:271-276, 1995; Cachero, T.G., Rocher, A., Rigual, R.J., and Gonzalez, C. Effects of fluoride and cholera and pertussis toxins on sensory transduction in the carotid body. Am.J.Physiol.Cell Physiol. 269:C1271-C1279, 1995).

Es hat sich herausgestellt, daß Probanden, die das GNB3-825T-Allel tragen, einen verminderten Antrieb der Atmung (Atemminutenvolumen) bei Erhöhung des inspiratorischen pCO₂ und damit eine gesteigerte CO₂-Toleranz zeigen. Eine erhöhte CO₂-Toleranz stellt insbesondere für solche Personen ein erhöhtes Risiko dar, in deren Arbeitsumgebung es zu einer CO₂-Akkumulation kommen kann. Die verminderte CO₂-Sensitivität beinhaltet dabei ein erhöhtes Risiko für eine spontan auftretende Bewußtlosigkeit, z.B. im Rahmen des narkotischen Effekts von CO₂. Betroffen hiervon sind z.B. Berufstaucher, Tunnelarbeiter, Piloten, U-Boot-Fahrer usw. Mit dem Nachweis des GNB3-825T-Allels können solche Personen identifiziert und gewarnt werden, so daß das Unfallrisiko vermindert wird.

9. Vorhersage von Osteoporose

Eine generalisierte Osteoporose stellt eine der häufigsten Erkrankungen von Frauen nach der Menopause dar und beinhaltet

ein erhöhtes Risiko für Knochenfrakturen. G-Proteine sind an Prozessen, die zum Umbau des Knochens führen, maßgeblich beteiligt. Eine veränderte Aktivierbarkeit von G-Proteinen ist damit erheblich am Erkrankungsrisiko für Osteoporose beteiligt (May, L.G. and Gay, C.V. Multiple G-protein involvement in parathyroid hormone regulation of acid production by osteoclasts. *J.Cell Biochem.* 64(1):161-170, 1997; Gordeladze, J.O., Lund, H.W., Jablonski, G., and Bruland, O.S. Diverse expression of G-proteins in human sarcoma cell lines with different osteogenic potential: Evidence for the involvement of G_{12} in cell proliferation. *J.Cell.Biochem.* 60:95-106, 1996).

Auch in diesem Fall zeigen Trägerinnen des GNB3-825T-Allels ein erhöhtes Risiko, an Osteoporose zu erkranken.

10. Vorhersage von Morbus Alzheimer

Eine geänderte Aktivierbarkeit von G-Proteinen und eine veränderte Regulation von K^+ -Kanälen wurde bei Patienten mit Morbus Alzheimer beschrieben. Ferner wurde eine verminderte Aktivierung der Adenylylcyclase nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren beschrieben. Diese Phänomene können auf eine erhöhte Aktivierbarkeit Pertussistoxin-sensitiver G-Proteine mit Expression der $G\beta 3s$ -Spleißvariante zurückgeführt werden (Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., and Nishimoto, I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J.Biol.Chem.* 270:4205-4208, 1995; Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G_0 . *Nature* 362:75-79, 1993; Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., and Alkon, D.L. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8209-8213, 1993; Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Zakeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S.,

Kinane, T.B., Giambarella, U., and Nishimoto, I. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. Science 272:1349-1352, 1996; Cowburn, R.F., Wiehager, B., Ravid, R., and Winblad, B. Acetylcholine muscarinic M2 receptor stimulated [³⁵S]GTPγS binding shows regional selective changes in Alzheimer's disease postmortem brain. Neurodegeneration 5:19-26, 1996).

Demzufolge weisen Träger des GNB3-825T-Allels ein erhöhtes Risiko auf, an Morbus Alzheimer zu erkranken. Zudem trägt die bei Trägern des GNB3-825T-Allels zu beobachtende früh einsetzende unter 3. beschriebene Atherosklerose zur Entstehung des Morbus Alzheimer bei.

11. Vorhersage einer erektilen Dysfunktion (Impotenz)

Die Erektion des Penis nach sexueller Stimulation wird durch einen gesteigerten Blutzufuß bei gleichzeitig vermindertem Blutabfluß hervorgerufen. Die für den gesteigerten Blutzufuß erforderlichen Mechanismen umfassen die Wirkungen von Hormonen, deren Wirkung über G-Proteine vermittelt wird.

Es wurden 63 Männer mit nachgewiesener erektiler Dysfunktion und 614 gesunde, männliche Kontrollen am GNB3 825-Locus genotypisiert:

	Erektile Dysfunktion	Kontrollmänner
TT	2 (3)	55 (9)
TC	20 (32)	275 (45)
CC	41 (65)	284 (46)
Summe	63	614
FT (%)	19,0 %	31,4 %

Die Zahlen sind n (%)

Die Verteilung der Genotypen ist signifikant verschieden (χ^2 -Quadrat = 8,7; 2 Freiheitsgrade, $p = 0,01$), wobei bei den Männern mit erektiler Dysfunktion eine drastische Reduktion der Frequenz des 825T-Allels auf 19 % auffällt. Hierdurch lassen sich für die erektile Dysfunktion im Vergleich zu einer randomisierten Kontrollgruppe die folgenden Risiken (odds ratios; OR) errechnen:

CC/TT, OR = 4,0 (95 % CI: 0,9 - 16,9; $p = 0,04$)

CC/TC, OR = 2,0 (95 % CI: 1,1 - 3,5; $p = 0,01$).

Damit haben homozygote C825-Allelträger gegenüber homozygoten 825T-Allelträgern ein 4-fach erhöhtes Risiko, gegenüber heterozygoten 825T-Allelträgern ein verdoppeltes Risiko, an einer erektilen Dysfunktion (Impotenz) zu erkranken. Ferner ist das Risiko für heterozygote 825T-Allelträger gegenüber homozygoten 825T-Allelträgern etwa verdoppelt.

12. Vorhersage von Schilddrüsenfunktionsstörungen

Träger des 825T-Allels weisen häufig eine gestörte Schilddrüsenfunktion auf und müssen mit Schilddrüsenhormonen (z. B. Thyroxin) behandelt werden.

13. Vorhersage eines erhöhten Schwangerschaftsrisikos

Hochdruck, Ödembildung und das sog. „HELLP-Syndrom“ bedeuten eine schwerwiegende Gefahr für die Schwangerschaft, sowohl für das Leben der Mutter als auch für das Leben des ungeborenen Kindes. Es wurde gefunden, daß bei Trägerinnen des 825T-Allels, die einen Schwangerschaftshochdruck entwickeln (Gestose, Präeklampsie) ein hohes Risiko für eine Frühgeburt (Geburt vor der 37. Schwangerschaftswoche oder Geburtsgewicht des Kindes kleiner als 2500g, siehe auch 14.) besteht, wobei für diese Kinder zusätzlich das Risiko für eine Totgeburt oder für einen Tod nach der Entbindung besteht. Gleichzeitig erhöht sich bei Frauen, die Trägerinnen des 825T-Allels sind und unter

Schwangerschaftsgestose leiden, das Risiko für spontane Aborte (habituelle Aborte).

Der Nachweis eines 825T-Allels ist daher geeignet, ein erhöhtes Todesrisiko für das ungeborene Kind von Schwangeren mit Schwangerschaftsgestose vorherzusagen.

Die Schwangerschaftsgestose (Präeklampsie) ist eine schwerwiegende Erkrankung, die mit Bluthochdruck, Ödemen und Proteinausscheidung einhergeht. Die Gestose ist mit einem erheblichen Risiko für die Schwangere, insbesondere aber für das ungeborene Kind verbunden. Es wurden 188 Frauen ohne Schwangerschaftsgestose und 191 Frauen mit Schwangerschaftsgestose untersucht. Dabei wurde der Genstatus am GNB3-Locus und der Genstatus bezüglich der Glu298Asp - Variante im Gen untersucht, das für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) kodiert. (Yoshimura et al. „A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese“, Hum Genet. 1998 Jul;103(1):65-9.)

Bei gleichzeitigem Vorliegen eines 825T-Allels in GNB3 (TC-oder TT-Genotyp) führt das homozygote Vorliegen der 298Asp-Variante in eNOS zu einem 10-fach gesteigerten Risiko für eine Schwangerschaftsgestose. Bei gleichzeitigem Vorliegen eines 825T-Allels in GNB3 (TC-oder TT-Genotyp) führt das heterozygote Vorliegen der 298Asp-Variante in eNOS zu einem 2-fach gesteigerten Risiko für eine Schwangerschaftsgestose.

14. Vorhersage eines niedrigen Geburtsgewichts

Bekannterweise besteht ein empirischer Zusammenhang, der eine inverse Relation zwischen Geburtsgewicht und dem Risiko beschreibt, im Laufe des Lebens an Übergewicht, Hypertonie, oder Typ-2- Diabetes zu erkranken. Hierbei wurde beschrieben, daß Individuen mit sehr niedrigem Geburtsgewicht besonders zu diesen Erkrankungen neigen. Es wurde deshalb untersucht, ob für

Kinder mit 825T-Allel ein erhöhtes Risiko besteht, mit niedrigem Geburtsgewicht auf die Welt zu kommen. Als niedriges Geburtsgewicht wurde dabei dasjenige Gewicht definiert, das sich nach Aufteilung aller Gewichte im niedrigsten Quartil der gesamten Verteilung befindet. Vergleicht man die Verteilung der Genotypen am GNB3-Locus zwischen dem 1. Quartil mit den zusammengefaßten Quartilen 2 - 4 so zeigt sich für homozygote 825T-Allelträger gegenüber homozygoten C825-Allelträgern ein 6-fach erhöhtes Risiko (95% CI = 1,3 - 28,6; $p < 0.05$) für niedriges Geburtsgewicht (Quartil 1 versus Quartile 2-4) und für heterozygote 825T-Allelträger ein 2,4-fach erhöhtes Risiko (95 % CI = 0,7 - 7,9).

G β 3 Gen 825T - Allel und Geburtsgewicht

	1. Quartil	2. Quartil	3. Quartil	4. Quartil	2.-4.Quar- til
Geburts- gewicht	-3130 g	-3430 g	-3750 g	> 3750 g	Alle > 3130 g
TT	5	1	2	2	5
TC	11	9	11	7	27
CC	5	11	8	11	30
Summe	21	21	21	20	62
% T	50	26	36	27,5	30

Nach einer Genotypisierung am GNB3-Locus wird also Trägern eines 825T-Allels ein erhöhtes Risiko zugeordnet, mit niedrigem Geburtsgewicht geboren zu werden und einer intrauterinen Wachstumsretardierung zu unterliegen.

15. Pharmakogenetik

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Pharmakogenetik des GNB3-825T-Allels, d.h. die Möglichkeit, anhand des Genotyps die Wirkung von Pharmaka vorherzusagen.

Die meisten Pharmaka (Hormone, Rezeptoragonisten) üben ihre Wirkung über Rezeptoren aus, die an G-Proteine koppeln. Antagonisten blockieren die Hormon- Rezeptor- Interaktion.

Es hat sich nun herausgestellt, daß die Genotypisierung am GNB3-Locus dazu geeignet ist, die Wirksamkeit von Pharmaka anhand des Genotyps vorherzusagen. Dies betrifft die Ansprechbarkeit in vivo auf Hormone, Transmitter (auch Neurotransmitter) oder Pharmaka, die solche G-Protein-Heterotrimere aktivieren, welche die G-Protein-Untereinheiten G β 3 und G β 3s beinhalten. Damit einher geht die Vorhersage einer verminderten Wirksamkeit von Hormonen, Neurotransmittern oder Pharmaka, welche die G-Protein-Untereinheit G α S stimulieren, z.B. β -adrenerge Agonisten. Dies gilt auch bei gleichzeitiger Verwendung des Nachweises der Arg16Gly-Variante und der Gln27Glu-Variante im β 2-adrenergen Rezeptor. Das Vorhandensein des GNB3-825T-Allels zeigt also eine veränderte Pharmakogenetik an und sollte bei der spezifischen Auswahl einer Therapieform (pharmakologisch oder nicht- pharmakologisch) und bei der Dosierung von Pharmaka oder Hormonen bei Hypertonie, Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt mit oder ohne Herzrhythmusstörungen, Herzrhythmusstörungen, Transplantatabstossung, erektiler Dysfunktion etc. berücksichtigt werden.

15.1 Erythropoetin

Im diesem Zusammenhang erlaubt das Vorhandensein des GNB3-825T-Allels aber auch die Vorhersage der Wirksamkeit der Gabe von Erythropoetin auf die Blutbildung und Vorhersage der Entstehung einer Hypertonie unter dieser Therapie sowie die Vorhersage der Gefahr, unter immunsuppressiver Therapie (z.B. mit Cyclosporin) eine Hypertonie zu entwickeln.

15.2 Agonisten am Serotonin-Rezeptor

Ebenfalls in diesem Zusammenhang kann die Wirksamkeit von Substanzen zu Therapie und Prophylaxe des Migräneanfalls (Agonisten am Serotonin-Rezeptor) vorhergesagt werden.

Dies wird anhand des folgenden Beispiels demonstriert. Hierbei wurde bei Probanden intrakoronar ein α_2 -adrenerger Agonist (BHT 933) appliziert, der zur Kontraktion von Koronargefäßen führt. Dieser Effekt wurde über die Flußänderung durch diese Gefäßabschnitte quantifiziert. Wie Fig. 8 zeigt, beobachtet man eine verstärkte Abnahme der Koronardurchblutung bei Trägern des GNB3-825T-Allels, unabhängig davon, ob sie an einer koronaren Herzkrankheit (KHK) erkrankt sind. Das heißt, daß bei Trägern des GNB3-825T-Allels eine Verstärkung der Wirkung solcher Pharmaka vorauszusagen ist.

15.3 β -Adrenozeptorblocker

Als weiteres Beispiel für den Einsatz einer Genotypisierung am GNB3-Locus ist die Vorhersage der Wirksamkeit von Substanzen zu benennen, welche β -adrenerge Rezeptoren blockieren. Hier ist anzuführen, daß junge, gesunde 825T-Allelträger (homo- oder heterozygot) im Vergleich zu homozygoten C825-Allelträgern ein erhöhtes Schlagvolumen des Herzens aufweisen ($TC/TT = 92,9 \pm 4,1$ ml ($n=30$); $CC = 74,7 \pm 4,0$ ml ($n=19$); $p<0,01$). Nach intravenöser Gabe des β -Adrenozeptorblockers Propanolol verringert sich das Schlagvolumen im Mittel um 3 ml bei homozygoten C825-Allelträgern, hingegen um 12 ml bei homo- und heterozygoten 828T-Allelträgern ($p<0,05$). In gleicher Weise findet sich eine verstärkte Verringerung des Herzzeitvolumens bei 825T-Allelträgern. Somit kann mittels Feststellung des GNB3 C825T-Status die pharmakologisch-physiologische Wirkung einer Blockade von β -adrenergen Rezeptoren vorhergesagt werden. Dies bezieht sich nicht nur auf nicht-selektive β -Blocker wie das

genannte Propanolol, sondern auf alle β -Adrenozeptorblocker, also auch selektive β_1 - und β_2 -Rezeptorblocker.

15.4 Prostaglandin E1

Bei Vorliegen einer erektilen Dysfunktion erfolgt zur diagnostischen Abklärung, aber auch, um möglicherweise eine Dauertherapie einzuleiten, eine Injektion von Prostaglandin E1 ins corpus cavernosum. Prostaglandin E1 aktiviert die Adenylcyclase, und die nachfolgende Bildung von cAMP relaxiert glatte Gefäßmuskelzellen und induziert damit einen erhöhten arteriellen Blutstrom und damit die Erektion des Penis. Der Grad der erfolgenden Erektion kann über ein Punktesystem (Score 0-5) quantifiziert werden. Hierbei entsprechen die Scores 4 und 5 einer suffizienten, für eine Penetration ausreichende Erektion, während Scores < 4 als nicht ausreichend zu betrachten sind.

Bei 87 Männern mit erektiler Dysfunktion erfolgte eine Gabe von 10µg Prostaglandin E1 mit Quantifizierung des Erektions-Scores. Hierbei ergab sich folgende Verteilung der Genotypen: Ausreichende Erektion (Scores 4 und 5): TT=3; TC=15; CC=16; (Frequenz des GNB3 825T-Allels: 30.9 %). Unzureichende oder fehlende Erektion: TT=3; TC=16; CC=34; (Frequenz des GNB3 825T-Allels: 20.8 %). In ähnlicher Weise findet man bei homozygoten C825-Allelträgern nach Injektion von Prostaglandin E1 einen verminderten Anstieg der dopplersonographisch gemessenen arteriellen Durchblutung.

Somit läßt sich homozygoten 825T-Allelträgern ein ca. verdoppeltes Risiko zuordnen, auf die Injektion mit Prostaglandin E1 nicht mit einer ausreichenden Erektion zu reagieren.

16. G β 3-Hemmer

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von Pharmaka, welche die G β 3s - Spleißvariante hemmen.

Prinzipiell ist es möglich, Chemikalien zu synthetisieren, welche die Funktion des G β 3s - Proteins hemmen, indem diese z.B. zu einem beschleunigten Abbau des Proteins führen, oder seine Interaktion und Kombination mit α - und γ - Untereinheiten des humanen G-Proteins hemmen. Zur Identifizierung solcher Substanzen ist ein Screeningsystem erforderlich. Hierzu eignet sich die Expression der G β 3s-Untereinheit alleine oder in Kombination mit unterschiedlichen G α - und G γ -Untereinheiten in Sf9-Insektenzellen, in anderen zur Transfektion geeigneten Zellen, oder die Verwendung gereinigter G α - und G γ β 3s - Untereinheiten in einem Rekonstitutionssystem in Ab- oder Anwesenheit eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Mittels solcher Systeme läßt sich z.B. die Wirkung von Chemikalien auf die Rezeptor- vermittelte Bindung von GTP an die G α -Untereinheit untersuchen, wodurch letztendlich Chemikalien identifiziert werden können, welche die Funktion der G β 3s-Untereinheit hemmen. Ein solches Testsystem kann prinzipiell auch als "High-Throughput-Screening-System" zur Testung einer Vielzahl von Substanzen eingesetzt werden.

Zweite Spleißvariante des G β 3s-Proteins (G β 3s-2)

Durch weitere Analysen des GNB3 Gens wurde eine weitere Spleißvariante der G β 3s-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine des Menschen gefunden, die mit G β 3s-2 bezeichnet wird.

Hierzu wurde aus neutrophilen Granulozyten von Menschen die homozygot für das C825 in GNB3 sind (CC-Genotyp), oder die heterozygot für den C825T - Polymorphismus sind (TC-Genotyp)

die mRNA mittels Standardmethoden extrahiert und mittels der reversen Transkriptasereaktion in cDNA umgeschrieben. Die cDNA, die für G β 3 kodiert wurde mittels einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Dabei kamen die folgenden Primer zum Einsatz:

Sense: 5' - gcc gtc aga ctt tca ctg gc - 3'

Antisense: 5'-tgt tca ctg cct tcc act tcc - 3'

Die Lokalisation dieser Primer ist so gewählt, daß ein Primer im Bereich von Exon 9 des Gens liegt, während der andere Primer in Exon 11 im 3'-nicht-translatierten Bereich liegt.

Die folgenden PCR-Bedingungen wurden eingesetzt:

5 min.: 94 °C - 1 min., 60 °C - 45 sek., 72 °C - 1 min.;

abschließend: 72 °C - 7 min.

Die PCR-Produkte wurden im 2,5 % Agarose-Gel in 0,5 x TBE plus 0,1 μ m/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert. Als Größenmarker wurde pBR322 DNA/Alu I eingesetzt.

Wie in Fig. 13 ersichtlich wird, detektiert man in Zellen von Personen, die an Position 825 der cDNA ein T-Allel tragen (heterozygot oder homozygot) ein weiteres spezifisches, verkürztes RT-PCR-Produkt.

Es wurde gefunden, daß das verkürzte PCR-Produkt eine neue Spleißvariante des G β 3-Gens repräsentiert. Eine Darstellung dazu findet sich in Anlage 3. Gezeigt wird die komplette Sequenz der cDNA, wie sie früher von Levine et al. beschrieben wurde (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87(6):2329-2333, 1990). Hierbei wird die ursprünglich von diesen Autoren vorgegebene Numerierung

beibehalten, so daß das Startkodon ⁴¹ATG der Position 6 der Nukleinsequenz zugeordnet wird.

Dargestellt ist die bereits früher beschriebene Deletion der Nukleotide 504 - 626 (entsprechend 498 - 620 falls die Numerierung mit dem Startkodon ATG beginnt), die durch alternatives Spleißen des Gens bei Trägern eines 825T-Allels bewirkt wird. In Anlage 3 wird dieser Bereich mit "Deletion in Gβ3s" bezeichnet (Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Horsthemke, B. Association of the human G-protein beta3 subunit variant with hypertension Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998). Die jetzt neu beschriebene Deletion tritt in Exon 10 des Gens auf, schließt den früher beschriebenen C825T-Polymorphismus mit ein und umfaßt 129 Nukleotide, was auf Proteinebene einem Verlust von 43 Aminosäuren entspricht (in Anlage 3 mit "Deletion in Gβ3s-2" bezeichnet). Der offene Leserahmen bleibt dabei erhalten. Die genaue Lage der Deletion läßt sich wegen repetitiver Sequenzen nicht eindeutig feststellen. Es können die Nukleotide 708 - 836 oder die Nukleotide 712 - 840 wegfallen. Legt man das ATG des Startkodons mit 1 fest, so entfallen die Nukleotide 702 - 830 bzw. 706 - 834. Die Kenntnis der genauen Lage dieser Deletion ist für die neue cDNA- und Aminosäuresequenzen von Gβ3s-2 unerheblich. In Anlage 3 sind ferner die Polymorphismusstellen C825T und C1423T dargestellt. Wegen der Verwendung der ursprünglichen Numerierung nach Levine et al. in Anlage 3 findet sich der C825T-Polymorphismus an Position 831 und der C1423T-Polymorphismus an Position 1249. Durch weiteres Sequenzieren wurde ein neuer T657A-Polymorphismus gefunden, der bei ca. 1-3 % aller Kaukasier auftritt.

Die neue cDNA-Sequenz von Gβ3s-2 ist in Anlage 4 gemeinsam mit der Aminosäuresequenz kombiniert dargestellt.

G-Protein β-Untereinheiten gehören zur Familie der WD-repeat-Proteine. Solche β-Untereinheiten sind hoch konserviert.

Bekannt ist die Tatsache, daß solche β -Untereinheiten eine räumliche Struktur ausbilden, die der eines Propellers mit sieben Propellerblättern ähnelt (Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.C., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. Crystal structure of a G protein $\beta\gamma$ dimer at 2.1Å resolution. Nature 379:369-374, 1996). Aufgrund der in G β 3s-2 auftretenden Deletion läßt sich vorhersagen, daß eine neue β -Untereinheit entsteht, welche, analog zu G β 3-s, nur sechs anstatt sieben solcher Rotorblätter aufweist. Dies ist in Fig. 14 schematisch dargestellt, wobei gleichzeitig die früher in G β 3-s gefundene Deletion gezeigt ist.

Zunächst wurde untersucht, ob G-Protein-Heterotrimere, welche G β 3s-2 beinhalten funktionell aktiv sind. Dazu wurde, wie früher beschrieben, das Sf9-Insektionzellsystem eingesetzt (Siffert, W. Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H., and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998). Die Zellen wurden mit G α i2, G γ 12 und dem m2-muskarinergen Acetylcholinrezeptor transfiziert. Die Bindung von 35S-GTP γ S an permeabilisierte Zellen wurde nach Stimulation mit Carbachol (100 μ M) quantifiziert. Hierbei ist der spezifische Einbau von 35S-GTP γ S ein Maß für die Aktivierung von G-Protein α -Untereinheiten. Wie in Fig. 15 dargestellt beobachtet man in Abwesenheit einer β -Untereinheit nur eine geringe G-Proteinaktivierung. Nach Transfektion von G β 3 oder G β 3s wird die G-Proteinaktivierung deutlich verstärkt, wobei G β 3s potenter als G β 3 ist. Die neue Splicevariante G β 3s-2 führt zur stärksten Potenzierung der durch den Agonisten Carbachol hervorgerufenen G-Proteinaktivierung. Damit wird gleichzeitig gezeigt, daß G β 3s-2 trotz der Deletion eines Propellerblatts funktionell aktiv ist und sogar zu einer verstärkten Aktivierung von G-Proteinen führt. Damit werden auch frühere

Befunde erklärt, die eine verstärkte Aktivierbarkeit von G-Proteinen in Zellen von Personen nachgewiesen haben, welche ein 825T-Allel tragen (Siffert, W., Rosскопф, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., Sharma, A.M., Ritz, E., Wichmann, H.E., Jakobs, K.H. and Horsthemke, B. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nat.Genet. 18(1):45-48, 1998. Pietruck, F., Moritz, A., Montemurro, M. Sell, A., Busch, S., Rosскопф, D., Virchow, S., Esche, H., Brockmeyer, N., Jakobs, K.H., and Siffert, W. Selectively enhanced cellular signalling by G_i proteins in essential hypertension. G_α₁₂, G_α₁₃, G_β₁ and G_β₂ are not mutated. Circ.Res. 79:974-983, 1996. Siffert, W., Rosскопф, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Bechmann, S., and Jakobs, K.H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. J.Clin.Invest. 96:759-766, 1995. Wirchow, S., Ansorge, N., Rübбен, H., Wiffert, G., and Siffert, W. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying out the G protein beta3 subunit 825 T-allele. FEBS Lett. 436(2):155-158, 1998).

Es ist allgemein bekannt, daß $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine unterschiedliche Isoformen der Phospholipase C β stimulieren können. Dieses Enzym spaltet Phospholipide, z.B. Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat zu den "second messenger"-Molekülen Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerol (DAG), IP3 bewirkt die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern, während DAG unterschiedliche Isoformen der Proteinkinase C aktivieren. Die Aktivierung von Phospholipase C ist damit ein wesentlicher Schritt in der Zellaktivierung. Es wurde untersucht, ob $\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche G β 3s-2 beinhalten, die Phospholipase C β 3 (PLC β 3) aktivieren können. Dazu wurde das COS-7 Zellsystem eingesetzt, welches in der allgemein zugänglichen Literatur häufig für die transiente Transfektion von Proteinen Verwendung findet. Diese Zellen wurden mit der PLC β 3, Gyl2 und

unterschiedlichen G β -Untereinheiten transfiziert. Die Zellen wurden mit radioaktiv markierten [3H]-Inositol vorbehandelt. Die Bildung von Inositolphosphaten (IP) wurde nach Standardverfahren quantifiziert, wobei die Menge der gebildeten IP ein Maß für die Aktivierung der PLC darstellt. Wie in Fig. 16 dargestellt, können $\beta\gamma$ -Dimere die G β 3, G β 3s oder G β 3s-2 enthalten die PLC β 3 aktivieren. Zum Vergleich ist ebenfalls die Aktivierung der PLC β 3 nach Transfektion von G β 1 gezeigt.

Diese Untersuchungen belegen, daß G β 3s-2 in der Lage ist, die Stimulation typischer zellulärer Effektorsysteme zu bewirken. Es handelt sich somit um ein voll funktionsfähiges Protein, wobei Personen, die ein 825T-Allel tragen und dieses Protein exprimieren, eine verstärkte zelluläre Aktivierbarkeit zuzuordnen ist.

Die aufgefundene Spleißvariante G β 3s-2 läßt sich dadurch vorteilhaft nutzen, daß entsprechende Proteine hergestellt werden mit dem Ziel, Chemikalien zu entwickeln oder zu testen, die das Protein hemmen oder seine Interaktion mit G-Protein α - oder γ -Untereinheiten verhindern.

Insbesondere im Bereich der Therapie ist es sinnvoll, in Kenntnis der aufgefundenen Splicevariante Zellen oder Gewebe stabil oder transient zu transfizieren. Ebenfalls zu therapeutischen Zwecken kann die G β 3s-2 Splicevariante in menschlichen oder tierischen Zellen oder Geweben exprimiert werden.

Eine weitere Verwendung der in Anlage 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz der cDNA besteht darin, Gensonden zum Nachweis dieser Nucleinsäuresequenz zu entwickeln.

Weiterhin kann in Zellen und Geweben eine Antisense-Konstrukte (z.B. Oligonukleotid) eingebracht werden mit dem Ziel, die Synthese der G β 3s-2 Splicevariante zu unterdrücken.

Antisense-Konstrukte können auch durch Zuhilfenahme unterschiedlicher Vektoren (z.B. gentechnisch veränderte Viren) in solche Zellen oder Gewebe eingebracht werden.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuresequenz codierend für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins mit der in Anlage 1 dargestellten Sequenz.
2. Nukleinsäuresequenz codierend für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins mit der in Anlage 2 dargestellten Sequenz.
3. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanes G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Ermittlung des Risikos, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken.
4. Verwendung nach Anspruch 3 zur Ermittlung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht und Adipositas, Hypercholesterinämie, koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt, plötzlichem Herztod, Osteoporose, Atherosklerose, neurodegenerativen oder cerebrovaskulären Erkrankungen, insbesondere Morbus Alzheimer, einer Krankheit, die auf einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystem beruht und/oder nicht an erektiler Dysfunktion zu erkranken.
5. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage des Risikos von Frauen, an einer kardiovaskulären Erkrankung, insbesondere Bluthochdruck oder koronare Herzkrankheit zu erkranken und zur Erstellung einer gezielten Hormontherapie um das kardiovaskuläre Risiko zu vermindern.

6. Verfahren zur Ermittlung⁴⁷ des Risikos eines Probanden, an einer mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheit zu erkranken, bei dem die Gensequenz für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins des Probanden mit der Gensequenz in Anlage 1 und/oder Anlage 2 vergleicht und für den Fall, daß sie mit der Gensequenz in Anlage 2 in Position 825 und/oder in Position 1429 übereinstimmt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im IRS2-Gen, im Gen, das für die p85 α -regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase kodiert. (1020 G \rightarrow A; Kodon 326 Met \rightarrow Ile), im Gen, das für den β 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg), im Gen, das für den β 2-adrenergen Rezeptor kodiert (hier insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante), im Gen, das für Tumornekrosefaktor α kodiert und/oder im Gen, das für Leptin oder den Leptinrezeptor kodiert, untersucht werden.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Übergewicht und Adipositas zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg), im Gen, das für den β 3-adrenergen Rezeptor kodiert (Trp64Arg-Variante) und/oder im Gen, das für den β 2-adrenergen Rezeptor kodiert, (insbesondere die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante) untersucht werden.
9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an koronarer Herzkrankheit und/oder Myokardinfarkt zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im IRS1-Gen (3931A-Variante; Gly971Arg) untersucht werden.

10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an Krankheiten, die mit einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit des Immunsystems assoziiert sind, zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im $\beta 2$ -adrenergen Rezeptor (insbesondere die Arg16Gly- Variante und die Gln27Glu-Variante) untersucht werden.

11. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos an Schwangerschaftsgestose zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im für die endotheliale NO-Synthase kodierenden Gen (insbesondere die Glu298Asp-Variante) untersucht werden.

12. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß homozygoten HIV-positiven Probanden ein erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an AIDS zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im CCR5-Gen untersucht werden und daß den homo- oder heterozygoten Probanden für den CCR5 Δ 32-Polymorphismus ein weiter erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos, an AIDS zu erkranken, gleichzeitig Genveränderungen im CCR5-Gen untersucht werden und daß den Probanden die das CCR5P1-Allel tragen ein weiter erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

15. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung des Risikos an AIDS zu erkranken, gleichzeitig bezüglich des SDF1-3'UTR-801G-A Polymorphismus untersucht werden und daß den Probanden, die das SDF1-3'A-Allel tragen ein weiter erhöhtes Risiko zugeordnet wird, an AIDS zu erkranken.

16. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Identifizierung von Personen mit erhöhter CO₂- bzw. Hypoxietoleranz.

17. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden in vivo auf Hormone, Transmitter (auch Neurotransmitter) oder Pharmaka, die solche G-Protein-Heterotrimere aktivieren, welche die G-Protein-Untereinheiten G β 3 und G β 3s beinhalten und/oder die G-Protein-Untereinheit G α S stimulieren.

18. Verwendung nach Anspruch 17 zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden, wobei gleichzeitig die Arg16Gly-Variante und die Gln27Glu-Variante im β 2-adrenergen Rezeptor nachgewiesen wird.

19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18 zur spezifischen Auswahl einer pharmakologischen oder nicht-pharmakologisch Therapieform bzw. der Dosierung von Pharmaka oder Hormonen bei Hypertonie, Diabetes mellitus, koronarer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt mit oder ohne Herzrhythmusstörungen, Herzrhythmusstörungen und Transplantatabstossung.

20. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, zur Vorhersage der Wirksamkeit der Gabe von Erythropoetin auf die Blutbildung und/oder Vorhersage der Entstehung einer Hypertonie unter dieser Therapie.

21. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, zur Vorhersage der Gefahr, unter immunsuppressiver Therapie, insbesondere mit Cyclosporin, eine Hypertonie zu entwickeln.
22. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18 zur Vorhersage der Wirksamkeit von Substanzen zu Therapie und Prophylaxe des Migräneanfalls.
23. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden in vivo auf β -Adrenozeptorblocker.
24. Verwendung einer Genveränderung im Gen für die G β 3-Untereinheit des humanen G-Proteins, wobei an Position 825 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt und/oder wobei an Position 1429 in Anlage 2 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt, zur Vorhersage der Ansprechbarkeit eines Probanden in vivo auf Substanzen mit einer Prostaglandin E₁-Wirkung, insbesondere Prostaglandin E₁.
25. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die komplementär zu der Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist, zur Herstellung eines Antisense-Arzneimittels zur Therapie oder Prävention von Krankheiten.
26. Verwendung des Proteins der G β 3s-Untereinheit des humanen G-Proteins in rekombinierten Systemen oder nach Transfektion in geeigneten Zelllinien zur Identifizierung von Chemikalien, welche die Funktion von G β 3s hemmen.

27. Beta-3 Untereinheit eines humanen G-Proteins, die höchstens sechs WD-Repeat-Motive aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Gβ3s-2 Untereinheit die in Anlage 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.
28. Nucleinsäuresequenz codierend für ein Protein nach Anspruch 27.
29. Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 28 mit der in Anlage 3 dargestellten Sequenz.
30. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nucleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 28 oder 29 ggf. mit geeigneten Regulationssignalen versieht und in einem Wirtsorganismus zur Expression bringt.
31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Expression in Immunzellen immundefizienter, insbesondere HIV-positiver Personen erfolgt.
32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Expression in humanen Körperzellen erfolgt.
33. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz gemäß Anspruch 28 oder 29 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten.
34. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, nach Anspruch 28 oder 29 zur Erzeugung transgener Tiere.
35. Verwendung einer Nucleinsäuresequenz, die komplementär zu der Nucleinsäuresequenz gemäß Anspruch 28 oder 29 ist zur Herstellung eines Antisense-Arzneimittels zur Therapie oder Prävention von Krankheiten, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert sind.

36. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 27 zur Herstellung
von spezifisch gegen dieses Protein gerichteten Antikörpern.

Fig. 1

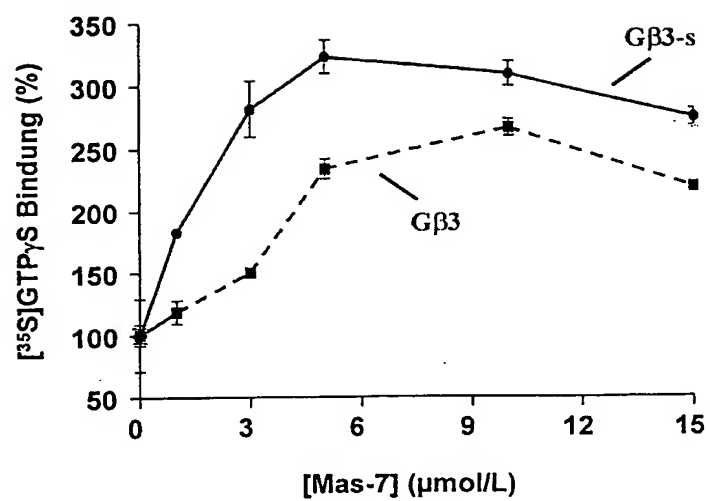


Fig. 2

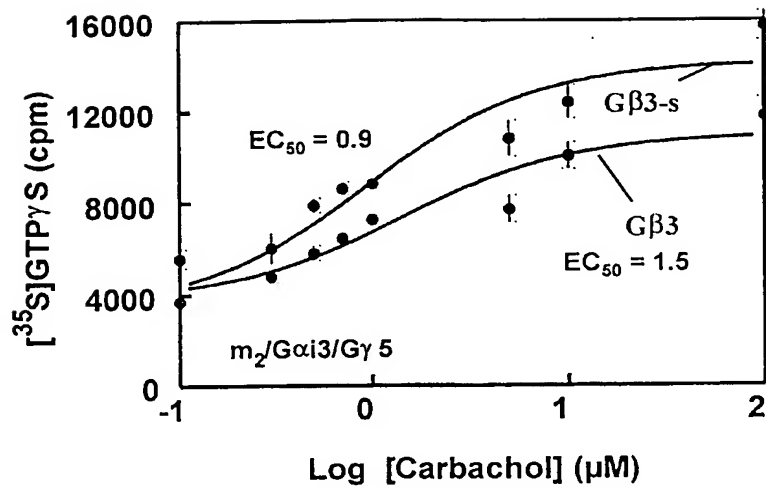


Fig. 3

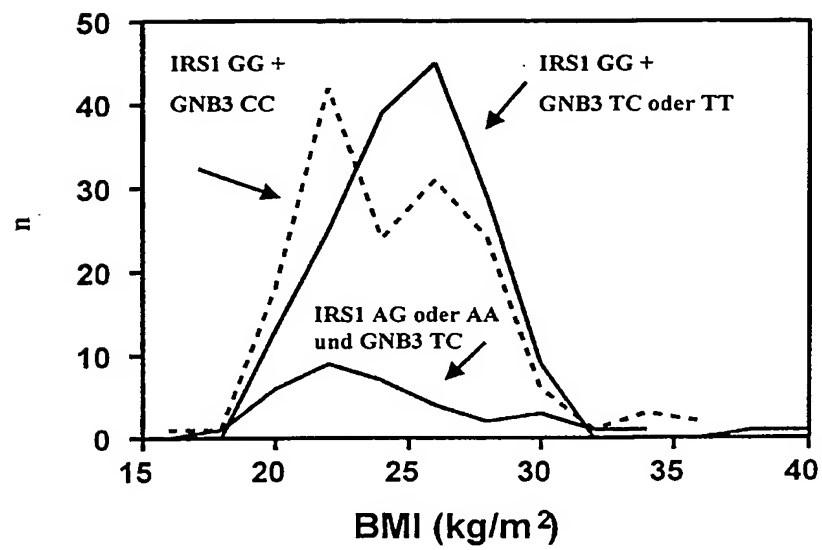
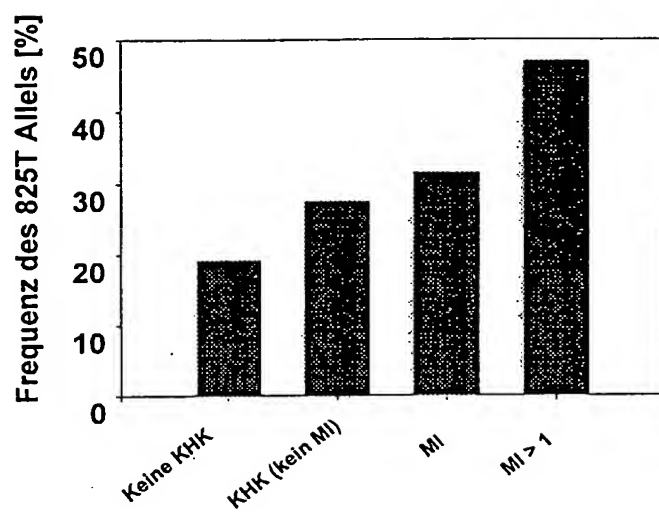


Fig. 4



ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

Fig. 5

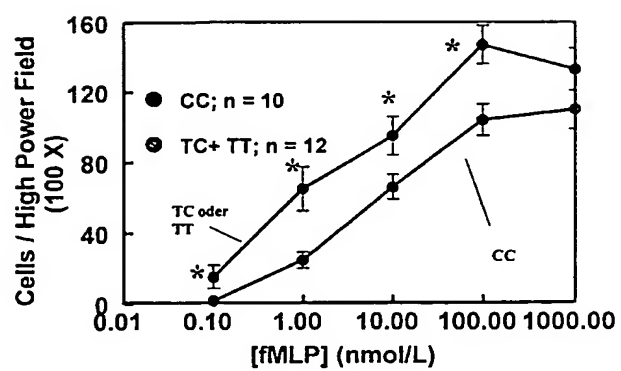


Fig. 6

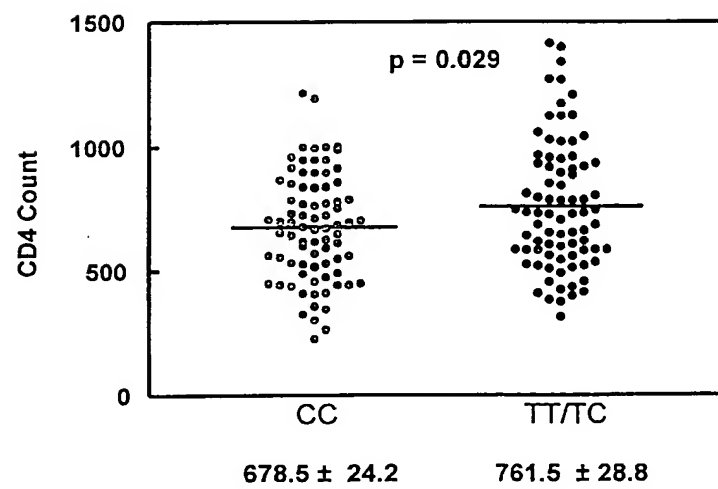


Fig. 7

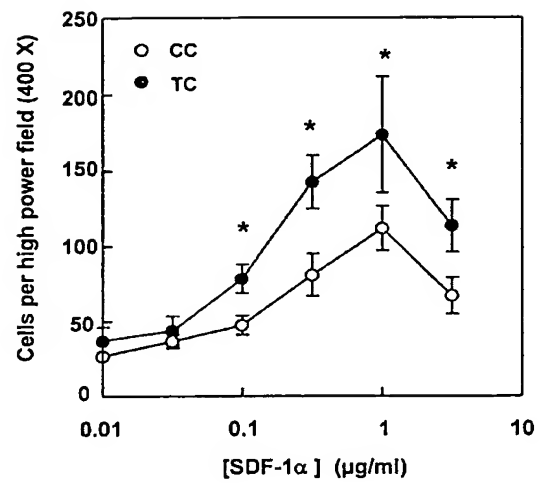


Fig. 8

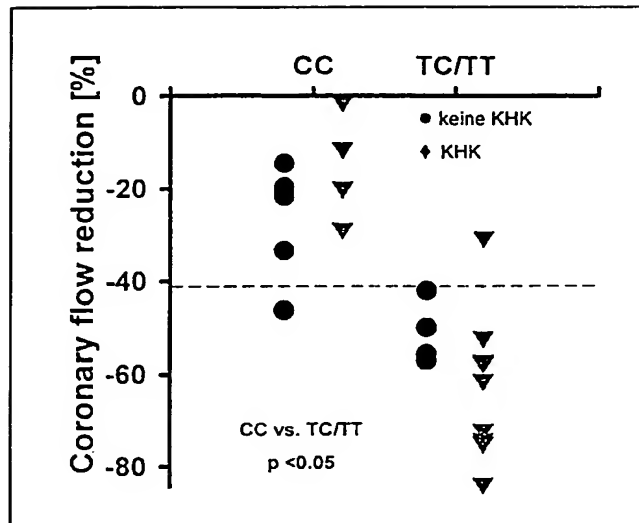


Fig. 9

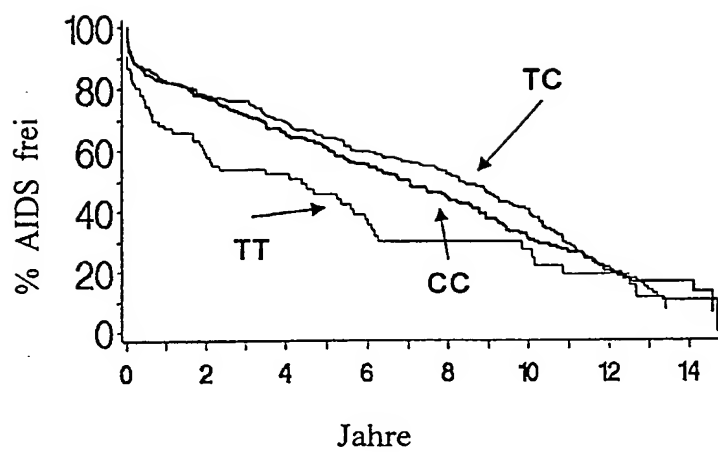


Fig. 10

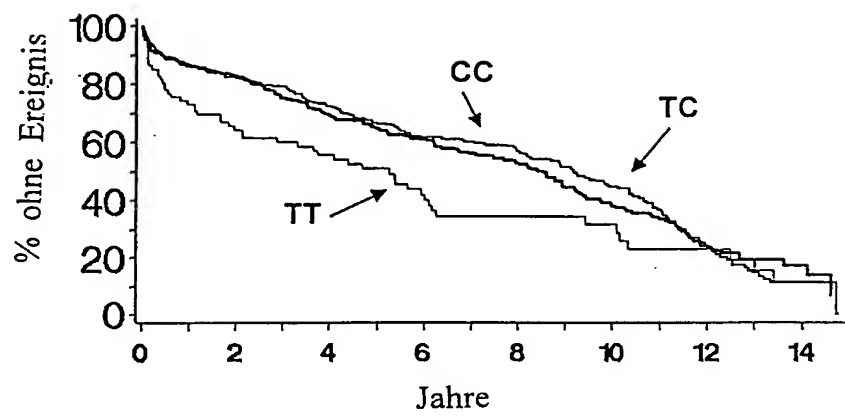


Fig. 11

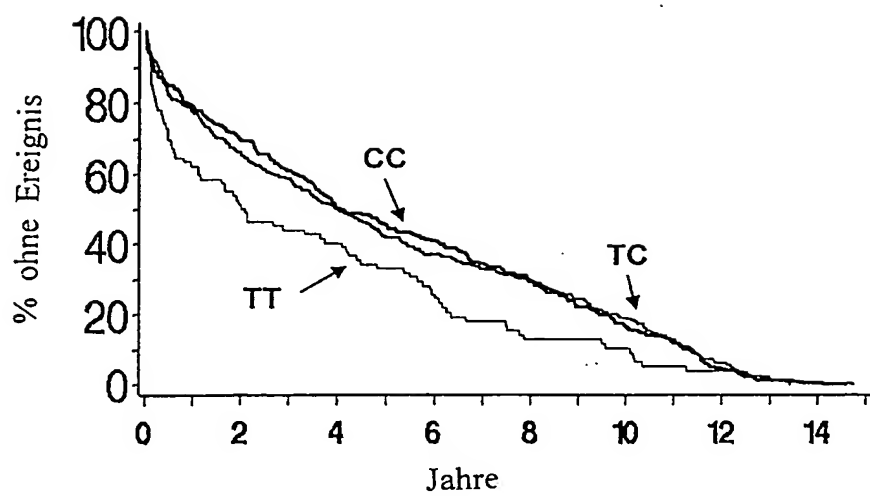


Fig. 12

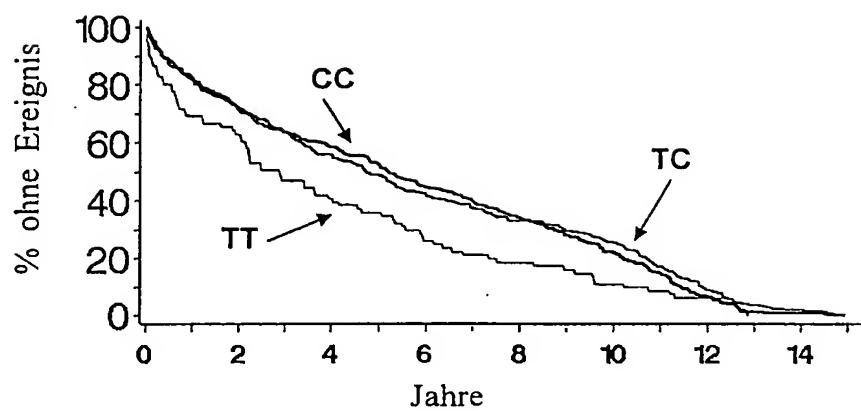
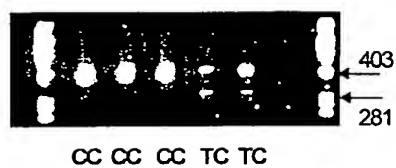


Fig. 13



ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

Fig. 14

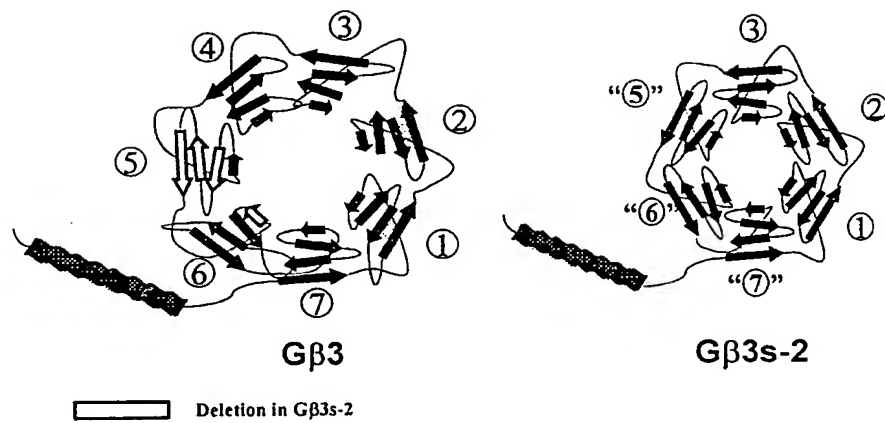
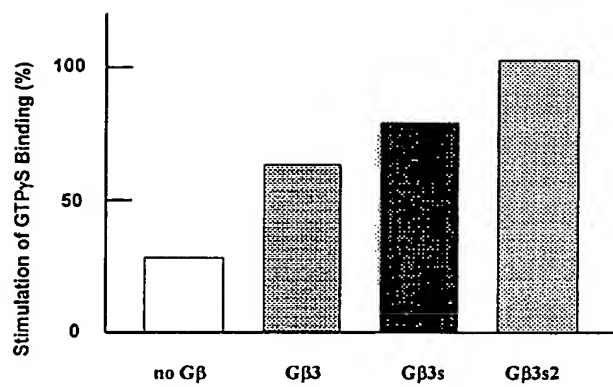


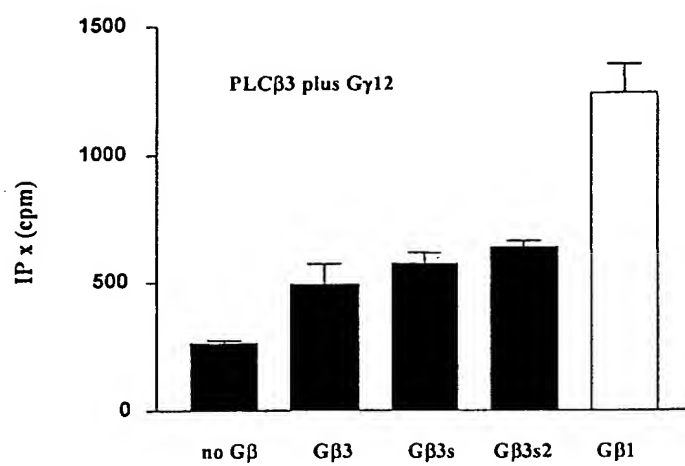
Fig. 15



ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

Fig. 16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

Anlage: Lokalisation des Polymorphismus in cDNA

Anlage 1: β 3-Originalsequenz von Levine

Die Exons sind wechselweise unterstrichen.
Der Bereich, der durch kryptisches Splicen wegfällt,
ist fettgedruckt.

- 1 gggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
Start-ATG EXON 3 nach Ansari-Lari
Nucleotide 1-6 scheinen nicht zuzutreffen
- 61 GCAGATGCCA GGAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG
/Beginn EXON 4 /EXON 5 Beginn
==> ENDE 1 KLON ANSARI
- 121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
EXON 5
- 181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCCTGCA AGATGGGAAG
EXON 5 / Beginn EXON 6
- 241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCACT GCGCTCCTCC
EXON 6 / EXON 7
- 301 TGGGTCATGA CCTGTGCTTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
EXON 7
- 361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
EXON 7
- 421 CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
EXON 7 /EXON 8
- 481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATTG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
EXON 8 /EXON 9
- kryptisches SPLICING
- 541 GTATTGTGTT GACACACGGG TGAATGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTCAATCTC
EXON 9
kryptisches SPLICING
- 601 TTCATTTCGG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
EXON 9
kryptisches SPLICING /
- 661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCCAATGGA
EXON 9 / Beginn EXON 10
- 721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTTTGACCT GCGGGCAGAC
EXON 10
- 781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC CGTGGCCTTC
EXON 10 Polymorphismusstelle: acgtc tgt
- 841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
EXON 10
- 901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
EXON 10 /Beginn EXON 11
- 961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCT GGGACAGCTT CCTCAAAATC
EXON 11
- 1021 TGGAACGTAG gaggctggag aaaggggaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc
EXON 11
End of Open Reading Frame
- 1081 tgcccgaccc catctcatc aggtgttctc ttctatatc cgggtgccat tcccactaag
EXON 11
- 1141 ctttctcctt tgagggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg
EXON 11
- 1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtctcac
EXON 11

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agccctttgc aggccagca
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca gccctagga ttctcccc agagccacta cctttgtcca
EXON 11

1381 ggcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcacga cta
EXON 11

1441 ggcctcttcc ttattcatgc ttctccttt ttctacctt tttctctcc taagacacct
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt
EXON 11 POLY A SITE

Anlage 2: Sequenz mit den beiden Polymorphismen
(Numerierung nach der Levine-Sequenz)

```
1   ggggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
61  GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG
121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCCT GCGCTCCTCC
301 TGGGTCATGA CCTGTGCTA TGCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
421 CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCCTGC TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTGTGCCTTG TGGGACATG AGACTGGGCA GCAGAAGACT
541 GTATTGTGG GACACACGGG TGACTGCATG AGCCTGGCTG TGTCTCCTGA CTTCAATCTC
601 TTCATTTGCG GGGCCTGTGA TGCCAGTGCC AAGCTCTGGG ATGTGCGAGA GGGGACCTGC
661 CGTCAGACTT TCACTGGCCA CGAGTCGGAC ATCAACGCCA TCTGTTTCTT CCCC AATGGA
721 GAGGCCATCT GCACGGGCTC GGATGACGCT TCCTGCCGCT TGTTTGACCT GCGGGCAGAC
781 CAGGAGCTGA TCTGCTTCTC CCACGAGAGC ATCATCTGCG GCATCACGTC TGTGGCCTTC
841 TCCCTCAGTG GCCGCCTACT ATTCGCTGGC TACGACGACT TCAACTGCAA TGTCTGGGAC
901 TCCATGAAGT CTGAGCGTGT GGGCATCCTC TCTGGCCACG ATAACAGGGT GAGCTGCCTG
961 GGAGTCACAG CTGACGGGAT GGCTGTGGCC ACAGGTTTCT GGGACAGCTT CCTCAAAATC
1021 TGGAACTGAG gaggctggag aaagggaaagt ggaaggcagt gaacacactc agcagccccc
1081 tgcccgaccc catctcattc aggtgttctc ttctatatcc cgggtgccat tcccactaag
1141 ctttctcctt tgaggggcagt ggggagcatg ggactgtgcc tttgggaggc agcatcaggg
1201 acacaggggc aaagaactgc cccatctcct cccatggcct tccctcccca cagtcctcac
1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gcccctcccc agccctttgc agggccagca
1321 gacttgagtc tgaggcccca ggccttagga ttctctcccc agagccacta cctttgtcca
1381 ggccctgggtg gtatagggcg tttggccctg tgactatggc tctggcacta ctagggtcct
1441 ggccctcttc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt ttttctctcc taagacacct
1501 gcaataaagt gtagcaccct ggt
```

Anlage 3

Nukleinsäuresequenz der cDNA von G β 3 und Darstellung der Deletionen in G β 3s und G β 3s-2

Numerierung bezogen auf die cDNA von Levine et al. (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(6):2329-2333, 1990) Die Numerierung beginnt hierbei nicht mit dem Startkodon ATG, sondern 6 Nukleotide früher im 5'-Bereich.

1 gggtcgATGG GGGAGATGGA GCAACTGCGT CAGGAAGCGG AGCAGCTCAA GAAGCAGATT
Start-ATG EXON 3
Nucleotide 1-6 scheinen nicht zuzutreffen

61 GCAGATGCCA GGAAAGCCTG TGCTGACGTT ACTCTGGCAG AGCTGGTGTC TGGCCTAGAG
/Beginn EXON 4 /EXON 5 Beginn

121 GTGGTGGGAC GAGTCCAGAT GCGGACGCGG CGGACGTTAA GGGGACACCT GGCCAAGATT
EXON 5

181 TACGCCATGC ACTGGGCCAC TGATTCTAAG CTGCTGGTAA GTGCCTCGCA AGATGGGAAG
EXON 5 / Beginn EXON 6

241 CTGATCGTGT GGGACAGCTA CACCACCAAC AAGGTGCACG CCATCCCCT GCGCTCCTCC
EXON 6 / EXON 7

301 TGGGTCATGA CCTGTGCCTA TGCCCCATCA GGGAACTTTG TGGCATGTGG GGGGCTGGAC
EXON 7

361 AACATGTGTT CCATCTACAA CCTCAAATCC CGTGAGGGCA ATGTCAAGGT CAGCCGGGAG
EXON 7

421 CTTTCTGCTC ACACAGGTTA TCTCTCTGCG TGCCGCTTCC TGGATGACAA CAATATTGTG
EXON 7 /EXON 8

481 ACCAGCTCGG GGGACACCAC GTG
EXON 8 /EXON 9

1261 agcctctccc ttaatgagca aggacaacct gccctcccc agcctttgc aggccagca
EXON 11

1321 gacttgagtc tgaggcccca ggcctagga ttcctcccc agagccacta cttttgtcca EXON
11

tctggcac~~ca~~ cta

1381 ggcctgggtg gtatagggcg ttggccctg tgactatggc tctggcac~~ca~~ ctagggtcct
EXON 11

1441 ggcctcttcc ttattcatgc tttctccttt ttctaccttt tttctctcc taagacacct
EXON 11

1501 gcaataaagt gtagcacct ggt
EXON 11 POLY A SITE

Anlage 4: Aminosäuresequenz von Gβ3s-2

Kombinierte Darstellung

1	Met Gly Glu Met Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Lys	16
1	ATG GGG GAG ATG GAG CAA CTG CGT CAG GAA GCG GAG CAG CTC AAG AAG	48
17	Gln Ile Ala Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Val Thr Leu Ala Glu	32
49	CAG ATT GCA GAT GCC AGG AAA GCC TGT GCT GAC GTT ACT CTG GCA GAG	96
33	Leu Val Ser Gly Leu Glu Val Val Gly Arg Val Gln Met Arg Thr Arg	48
97	CTG GTG TCT GGC CTA GAG GTG GTG GGA CGA GTC CAG ATG CGG ACG CGG	144
49	Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Ala	64
145	CGG ACG TTA AGG GGA CAC CTG GCC AAG ATT TAC GCC ATG CAC TGG GCC	192
65	Thr Asp Ser Lys Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile	80
193	ACT GAT TCT AAG CTG CTG GTA AGT GCC TCG CAA GAT GGG AAG CTG ATC	240
81	Val Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg	96
241	GTG TGG GAC AGC TAC ACC ACC AAC AAG GTG CAC GCC ATC CCA CTG CGC	288
97	Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Phe Val	112
289	TCC TCC TGG GTC ATG ACC TGT GCC TAT GCC CCA TCA GGG AAC TTT GTG	336
113	Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Met Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Ser	128
337	GCA TGT GGG GGG CTG GAC AAC ATG TGT TCC ATC TAC AAC CTC AAA TCC	384
129	Arg Glu Gly Asn Val Lys Val Ser Arg Glu Leu Ser Ala His Thr Gly	144
385	CGT GAG GGC AAT GTC AAG GTC AGC CGG GAG CTT TCT GCT CAC ACA GGT	432
145	Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Asn Ile Val Thr Ser	160
433	TAT CTC TCC TGC TGC CGC TTC CTG GAT GAC AAC AAT ATT GTG ACC AGC	480
161	Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln	176
481	TCG GGG GAC ACC ACG TGT GCC TTG TGG GAC ATT GAG ACT GGG CAG CAG	528
177	Lys Thr Val Phe Val Gly His Thr Gly Asp Cys Met Ser Leu Ala Val	192
529	AAG ACT GTA TTT GTG GGA CAC ACG GGT GAC TGC ATG AGC CTG GCT GTG	576
193	Ser Pro Asp Phe Asn Leu Phe Ile Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala	208
577	TCT CCT GAC TTC AAT CTC TTC ATT TCG GGG GCC TGT GAT GCC AGT GCC	624

209 Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Thr Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly , 224
625 AAG CTC TGG GAT GTG CGA GAG GGG ACC TGC CGT CAG ACT TTC ACT GGC 672

225 His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Ser Leu Ser Gly Arg 240
673 CAG GAG TCG GAC ATC AAC GCC ATC TGT TTC TTC TCC CTC AGT GGC CGC 720

241 Leu Leu Phe Ala Gly Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ser 256
721 CTA CTA TTC GCT GGC TAC GAC GAC TTC AAC TGC AAT GTC TGG GAC TCC 768

257 Met Lys Ser Glu Arg Val Gly Ile Leu Ser Gly His Asp Asn Arg Val 272
769 ATG AAG TCT GAG CGT GTG GGC ATC CTC TCT GGC CAC GAT AAC AGG GTG 816

273 Ser Cys Leu Gly Val Thr Ala Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser 288
817 AGC TGC CTG GGA GTC ACA GCT GAC GGG ATG GCT GTG GCC ACA GGT TCC 864

289 Trp Asp Ser Phe Leu Lys Ile Trp Asn ***
865 TGG GAC AGC TTC CTC AAA ATC TGG AAC TGA

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.